

Université de Montréal

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE
D'UNE LIGNÉE DE SOURIS TRANSGÉNIQUES
DÉMONTRANT DE L'INFERTILITÉ MÂLE

Par

MARILENE PAQUET

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maîtrise ès science (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Août , 2006

© Marilène Paquet 2006



SF

607

US4

2006

V032

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Mémoire intitulé

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE
D'UNE LIGNÉE DE SOURIS TRANSGÉNIQUES
DÉMONTRANT DE L'INFERTILITÉ MÂLE

Présenté par

MARILENE PAQUET

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Monique Doré, présidente-rapporteuse

Pierre Hélie, directeur de recherche

David W. Silversides, co-directeur

Richard Drolet, membre du jury

RÉSUMÉ

Le phénotype et le génotype d'une lignée de souris transgéniques créée par microinjection pronucléaire et démontrant de l'infertilité mâle ont été étudiés. Du point de vue génétique, l'interférence des transgènes avec un ou plusieurs gènes endogènes était suspectée. La caractérisation du génotype visait donc à déterminer le ou les gènes endogènes affectés par l'insertion des transgènes à l'aide de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et par l'adaptation d'une technique basée sur l'amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR) utilisant le protocole de « Universal GenomeWalker Kit ». Du point de vue phénotypique, un examen préliminaire sur deux souris a révélé de l'oligospermie et des lésions testiculaires dégénératives suggérant une base morphologique pour l'infertilité. La caractérisation phénotypique visait ainsi à décrire les changements morphologiques expliquant l'infertilité observée chez les souris mâles homozygotes. L'hybridation *in situ* en fluorescence a démontré un seul site d'intégration localisé dans la région F3 du chromosome 3. Un fort signal de fluorescence à cet endroit signifiait un grand nombre de copies des transgènes. En raison de quelques problèmes intrinsèques au protocole de « Universal GenomeWalker », nous n'avons pas obtenu de résultats concluant sur la localisation plus précise des transgènes dans la région F3 de ce chromosome et sur l'identité du/des gènes potentiellement affectés. La caractérisation du phénotype a démontré des changements histopathologiques interprétés comme une dysplasie tubulaire dans la tête de l'épididyme qui sont vraisemblablement responsables de l'oligospermie observée chez ces souris ainsi que des changements dégénératifs secondaires dans le testicule.

Mots clés : souris, transgéniques, infertilité mâle, génotype, phénotype

SUMMARY

The genotype and phenotype of a line of transgenic mice created by pronuclear microinjection and presenting male infertility were studied. At the genomic level, interference of the transgenes with one or more endogenous gene(s) was suspected. Genomic analyses were undertaken to determine the identity of the disrupted endogenous gene (s) by determining the site of transgene insertion using two techniques: fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and a polymerase chain reaction-based technique (PCR). Phenotypically, a preliminary examination on two mice revealed oligospermia and degenerative testicular changes that suggested a morphologic basis for the infertility observed. Characterization of the phenotype was undertaken to identify and describe the morphologic changes that could explain the infertility of these mice. The FISH identified a single insertion site and a large number of copies of transgenes in the F3 region of chromosome 3. Because of intrinsic problems with the method used, the PCR-based technique did not give us the precise localization of the insertion site on chromosome 3 and the identity of the potentially disrupted endogenous gene(s). The phenotypic examination revealed dysplastic changes in the head of epididymis as the likely cause of oligospermia and secondary degenerative changes observed in the testis.

Key words: mice, transgenic, male infertility, phenotyping, genotyping

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----|
| PAGE TITRE | i |
| PRÉSENTATION DU JURY | ii |
| SOMMAIRE | iii |
| SUMMARY | iv |
| TABLE DES MATIÈRES | v |
| LISTE DES FIGURES | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xii |
| REMERCIEMENTS | xiv |
| 1 RECENSION DE LA LITTÉRATURE | 1 |
| 1.0 Introduction | 1 |
| 1.1 La souris de laboratoire | 1 |
| 1.1.1 Évolution de la souris de laboratoire | 1 |
| 1.1.2 Création des souris transgéniques par microinjection pronucléaire | 5 |
| 1.1.2.1 La technique de micro-injection pronucléaire | 5 |
| 1.1.2.2 Facteurs qui influencent le phénotype d'une souris transgénique | 8 |
| 1.1.3 Identification du site d'intégration du transgène dans le génome | 12 |
| 1.1.3.1 L'hybridation <i>in-situ</i> en Fluorescence (FISH) | 12 |
| 1.1.3.2 Le « Universal GenomeWalker » | 14 |
| 1.2 L'étude du système reproducteur | 14 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.2.1 | Développement embryonnaire des gonades | 14 |
| 1.2.1.1 | Étapes de détermination du sexe | 14 |
| 1.2.1.2 | Développement embryonnaire du testicule | 16 |
| 1.2.2 | Développement postnatal du testicule | 17 |
| 1.2.2.1 | L'épithélium germinale | 17 |
| 1.2.2.2 | Formation de la barrière hémato-testiculaire et ses rôles | 18 |
| 1.2.3 | Puberté | 19 |
| 1.2.3.1 | Morphologie du testicule adulte | 19 |
| 1.2.3.2 | Spermatogenèse | 21 |
| 1.2.3.3 | La Spermiogénèse | 23 |
| 1.2.3.4 | Cycle spermatogénique de la souris | 23 |
| 1.2.4 | Canaux excréteurs | 24 |
| 1.2.4.1 | Développement embryonnaire des canaux mésonephrotiques | 24 |
| 1.2.4.2 | Développement postnatal des canaux excréteurs | 25 |
| 1.2.4.3 | Particularités physiologiques des canaux excréteurs | 27 |
| 1.2.5 | Glandes accessoires | 28 |
| 1.2.5.1 | Origines embryonnaires des glandes accessoires | 28 |
| 1.2.5.2 | Développement postnatal des glandes accessoires | 29 |
| 1.2.5.3 | Morphologie des glandes accessoires adultes | 29 |
| 1.2.6 | Physiologie du système reproducteur mâle | 31 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 1.2.6.1 | Contrôle hormonal du système reproducteur mâle | 31 |
| 1.2.6.2 | Rétrocontrôle hormonal du système reproducteur mâle | 33 |
| 1.3 | Infertilité mâle (Troubles affectant les testicules ou les canaux excréteurs) | 33 |
| 1.3.1 | Causes pré-testiculaires affectant les testicules ou les canaux excréteurs | 33 |
| 1.3.1.1 | Désordres hypothalamiques et pituitaires | 33 |
| 1.3.2 | Causes testiculaires | 34 |
| 1.3.2.1 | Problèmes héréditaires-congénitaux | 34 |
| 1.3.2.2 | Dégénérescence-Atrophie testiculaire | 35 |
| 1.3.2.2.1 | La définition | 35 |
| 1.3.2.2.2 | Les causes de la dégénérescence testiculaire | 35 |
| 1.3.2.2.2.1 | Les agents toxiques | 36 |
| 1.3.2.2.2.2 | L'inflammation | 36 |
| 1.3.2.2.2.3 | L'amyloïdose systémique | 37 |
| 1.3.2.2.2.4 | Désordres vasculaires | 38 |
| 1.3.3 | Causes post- testiculaires | 38 |
| 1.3.3.1 | Troubles congénitaux/ héréditaires affectant les canaux efférents et l'épididyme | 38 |
| 1.3.3.1.1 | Canaux efférents en cul-de-sac | 38 |
| 1.3.3.1.2 | Problème dans la transition entre les canaux efférents et l'épididyme | 39 |
| 1.3.3.1.3 | L'aplasie des canaux excréteurs | 41 |
| 1.3.3.2 | Désordres acquis affectant les canaux efférents et | |

| | |
|--|----|
| les épидидymes | 41 |
| 1.3.3.2.1 L'inflammation | 41 |
| 1.3.3.2.2 Les toxines affectant les canaux excréteurs | 42 |
| 1.3.4 Conséquences de l'obstruction des canaux efférents et des épидидymes sur la morphologie du testicule. | 42 |
| 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS | 44 |
| 3. MÉTHODOLOGIE | 45 |
| 3.1 Les Souris transgéniques anti-5 | 45 |
| 3.1.1 La lignée | 45 |
| 3.1.2 Caractéristiques des transgènes | 45 |
| 3.1.3 La création des souris transgéniques par micro-injection pronucléaire | 46 |
| 3.1.4 Lignée transgénique anti-5 | 46 |
| 3.2 Caractérisation génique | 47 |
| 3.2.1 Identification du site d'insertion du transgène | 47 |
| 3.2.1.1 L'hybridation <i>in situ</i> en Fluorescence (FISH) | 48 |
| 3.2.1.2 Le « Universal GenomeWalker » | 49 |
| 3.3 Caractérisation morphologique | 52 |
| 3.3.1 Les nécropsies | 52 |
| 3.3.2 Analyses statistiques | 54 |
| 4. PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS | 55 |
| 4.1 Résultats de la caractérisation génique | 55 |
| 4.1.1 Identification du site d'insertion du transgène par l'hybridation | |

| | |
|---|----|
| <i>in situ</i> en fluorescence | 55 |
| 4.1.2 Identification du site d'insertion du transgène par PCR | 56 |
| 4.2 Résultats de la caractérisation morphologique | 57 |
| 4.2.1 Données objectives | 57 |
| 4.2.2 Changements morphologiques | 57 |
| 5. DISCUSSION | 63 |
| 5.1 Caractérisation génique | 63 |
| 5.2 Caractérisation morphologique | 64 |
| 5.3 Caractérisation génomique | 67 |
| 6. CONCLUSION ET DIRECTIONS FUTURES | 70 |
| 7. BIBLIOGRAPHIE | 72 |
| 8. ANNEXES | xv |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|-------------|---|----|
| Figure 1. | La microinjection pronucléaire (schéma de la technique) | 6 |
| Figure 2. | La microinjection pronucléaire : Microinjection dans le pronoyau mâle. | 6 |
| Figure 3. | Idiogramme de souris mâle | 13 |
| Figure 4. | Les tubules séminifères : anatomie microscopique. | 18 |
| Figure 5. | Le testicule et l'épididyme de souris : anatomie macroscopique. | 19 |
| Figure 6. | Les tubules séminifères (schéma). | 20 |
| Figure 7. | Le rete testis : anatomie microscopique. | 21 |
| Figure 8. | La spermatogénèse (schéma). | 22 |
| Figure 9. | Le cycle spermatogénique (schéma) | 23 |
| Figure 10. | Les canaux efférents chez la souris (schéma) | 26 |
| Figure 11. | L'épididyme : anatomie microscopique | 27 |
| Figure 12. | Le système reproducteur mâle murin (schéma) | 28 |
| Figure 13 | Jonction entre le canal efférent et l'épididyme chez le porc | 40 |
| Figure 14. | Souris transgéniques de la lignée anti-5 | 47 |
| Figure 15. | Karyotype de souris transgénique anti-5 homozygote | 55 |
| Figure 16. | L'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (souris anti-5 homozygote) | 56 |
| Figure 17a. | Souris anti-5 homozygote: testicule ; dégénérescence testiculaire modérée multifocale avec atrophie de l'épithélium séminifère | 58 |
| Figure 17b. | Souris anti-5 hétérozygote : testicule normal | 58 |
| Figure 18a. | Souris anti-5 homozygote: tubules séminifères ; atténuation de l'épithélium séminifère avec perte des spermatides, des spermatocytes et vacuolisation des cellules de Sertoli | 59 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figure 18b. | Souris anti-5 hétérozygote : tubules séminifères normaux | 59 |
| Figure 19a. | Souris anti-5 homozygote : rete testis; spermiostase modérée avec présence de cellules germinales (spermatides ronds et allongés) et débris cellulaires | 60 |
| Figure 19b. | Souris anti-5 hétérozygote : rete testis normal | 60 |
| Figure 20a. | Souris anti-5 homozygote : canaux efférents ; spermiostase modérée avec cellules germinales. | 60 |
| Figure 20b. | Souris anti-5 hétérozygote : canaux efférents normaux | 60 |
| Figure 21a. | Souris anti-5 homozygote : épидидyme; oligospermie diffuse sévère | 61 |
| Figure 21b. | Souris anti-5 hétérozygote : épидидyme normal | 61 |
| Figure 22a. | Souris anti-5 homozygote : épидидyme (tête); dysplasie tubulaire modérée multifocale avec sténose tubulaire. | 62 |
| Figure 22b. | Souris anti-5 hétérozygote : épидидyme (tête) normal | 62 |
| Figure 23 | Régions synténiques entre la région F3 du chromosome 3 murin et les régions correspondantes sur le chromosome 1 humain | 68 |

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| cAMP | Adénosine monophosphate cyclique |
| Cre | Élément de réponse de cAMP |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-phenylindole |
| DHT | dihydroxytestostérone |
| E2 | Estradiol |
| ER α | Récepteur à l'estradiol |
| F0 | Souris transgéniques fondatrices |
| F1 | Souris transgénique, première génération |
| F2 | Souris transgénique, seconde génération |
| FISH | Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence |
| FITC | Fluorescéine |
| Flp | Protéine fimbria-like |
| FSH | Hormone folliculo-stimulante |
| GnRH | Gonadolibérine |
| H&E | Hématoxyline et éosine |
| IFN γ | Interféron gamma |
| Il-1 | Interleukine-1 |
| Il-6 | Interleukine-6 |
| IPTG | isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside |
| LacZ | Gène rapporteur de bêta-galactosidase |

| | |
|--------------|---|
| LCR | “Locus Control Région” |
| LH | Hormone lutéinisante |
| LIF | “Leukemia inhibitory factor” |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MLV | Virus de la leucémie murine |
| 4N | Nombre tétraploïde de chromosomes |
| 1N | Nombre haploïde de chromosomes |
| PAS | “Periodic Acid Schiff” |
| PCR | Reaction par polymérase en chaîne |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Solution) |
| SCF | “Stem Cell Factor” |
| S/MARS | “Scaffold / Matrix Attachment Regions” |
| SRY | Région déterminante du sexe sur le chromosome Y |
| SV40 | “Simian virus 40” |
| TDF | “Testis Determining Factor” |
| TGF- β | “Transforming growth factor beta” |
| TNF | “Tumor Necrosis Factor ” |
| TyBs | Sonde spécifique pour le gène de la tyrosinase |
| μ L | Microlitre |
| μ m | Micromètre |

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas pu être entrepris et complété sans le précieux support de mon directeur et celui de mon co-directeur, les docteurs Pierre Hélie et David Silversides. La flexibilité du projet de recherche m'a permis d'explorer de nouvelles avenues en pathologie vétérinaire et m'a également permis d'apprendre plusieurs techniques de biologie moléculaire.

Je tiens également à remercier la Dre Cory Brayton, professeure agrégée à l'Université Johns Hopkins, pour son aide, support et amitié tout au cours de ce projet.

Une assistance précieuse m'a également été fournie par trois grands chercheurs ayant dévoué leur carrière à l'étude du système reproducteur mâle: Dre Dianne Creasy, pathologiste au Huntingdon Life Sciences du New Jersey, Dr Richard Hess, professeur au Collège de Médecine Vétérinaire de l'Université de l'Illinois et le Dr Marvin Meistrich, professeur au MDAnderson Cancer Center à l'Université du Texas.

Je tiens à remercier Monsieur Wilbur Harrison ainsi que le Dr Paul Overbeek au Baylor College of Medicine pour leur enseignement et leur support technique.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon comité de maîtrise pour leur dévouement, leur temps et leurs précieux conseils tout au long de mon projet.

Finalement, je tiens à remercier de tout cœur mon partenaire et mon plus grand collaborateur Derek Boerboom pour son support, sa patience, son enseignement et tous ses précieux conseils.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1.0 Introduction

Une lignée de souris transgéniques créées par microinjection pronucléaire a été initialement conçue afin d'étudier le système reproducteur durant le développement embryonnaire. Cependant, les mâles homozygotes de cette lignée de souris se sont avérés infertiles ce qui les rendaient inutiles pour l'expérimentation initialement prévue. Le problème d'infertilité mâle transmis de façon récessive dans cette lignée de souris soulevait néanmoins de nombreuses interrogations aux points de vue moléculaire et morphologique. Ce projet de recherche a donc été entrepris afin de cerner les changements génétiques et morphologiques qui contribuent à expliquer l'infertilité observée chez les souris mâles homozygotes de la lignée de souris transgéniques anti-5.

1.1 La souris de laboratoire

1.1.1 Évolution de la souris de laboratoire

La souris de laboratoire a une histoire longue et profitable en recherche biomédicale. Son histoire débute il y a des centaines d'années lorsque l'être humain a remarqué les nombreuses mutations de la couleur du pelage survenant de façon spontanée dans les souches de souris sauvages. Les chinois et les japonais furent les premiers à domestiquer la souris au début du 17^{ème} siècle (1). Cette pratique fut adoptée plus tard par les Européens qui ont débuté les premiers élevages de souris, ont fait des croisements et ont ainsi sélectionné certaines caractéristiques conduisant à la souris de laboratoire telle que nous la connaissons aujourd'hui (2).

L'étude de la génétique chez les mammifères débute avec la redécouverte de la loi de Mendel en 1900 (1). C'est au début du XX^{ème} siècle que les principaux progrès

surviennent dans le domaine de la génétique chez la souris de laboratoire avec l'apparition des premières lignées de souris cosanguines dans lesquelles chaque individu possède essentiellement la même base génétique (1). Ces lignées cosanguines ont été obtenues par de multiples croisements entre frères et sœurs jusqu'à ce que tous les loci génétiques soient essentiellement homozygotes (1). De nos jours, il y a plus de 400 lignées cosanguines utilisées en recherche biomédicale (1).

L'étude de l'embryologie chez les mammifères précède de plusieurs années celle de la génétique (1). En raison de son développement dans l'utérus, l'embryon de souris ne convenait pas à des études descriptives et a donc été surpassé par des modèles expérimentaux comme l'embryon de poussin et celui du têtard (1). Ce n'est qu'entre les années 1950 et 1960 que plusieurs chercheurs ont obtenu des résultats concluants sur la culture d'embryons de souris *in vitro*. À la fin des années 50, il était finalement possible de réintroduire des embryons cultivés dans l'utérus de souris pseudogestante permettant ainsi d'obtenir des souriceaux à partir d'embryons manipulés *in vitro* (1). Ces avancements technologiques faisaient qu'il était possible à ce moment de tester le résultat final de manipulations expérimentales sur un grand nombre d'embryons. Dans les années 60, des animaux adultes chimériques pouvaient être générés et caractérisés (3). Les premières descriptions de manipulations physiques conduisant à l'introduction de matériel exogène dans le pronoyau de zygotes remonte à 1966 avec l'injection de gammaglobuline bovine dans un blastocyte (4). En 1974, des expériences impliquant l'injection d'ADN viral (SV40) dans le blastocyte de souris sont décrites (3). En 1976, Jaenisch découvre que le virus de la leucémie murine (MLV) peut s'introduire de façon stable dans la lignée germinale suite à l'infection des embryons au stade préimplantation

(5). Ces recherches ainsi que d'autres portant sur les fibroblastes en culture (6, 7) ont suggéré que la micro-injection d'ADN exogène dans un œuf fécondé pouvait permettre l'introduction et l'intégration de gènes exogènes dans le génome de la souris en développement (6, 7).

Les premières expérimentations portant sur l'introduction d'un gène cloné dans les tissus somatiques d'une souris par la technique de micro-injection pronucléaire ont été rapportées par Gordon et al. en 1980 (8). Plusieurs groupes ont ensuite emboîté le pas en rapportant l'introduction de gènes clonés dans les tissus somatiques de souris (9-12). Ces études expérimentales ont démontré que le transgène pouvait s'intégrer dans le génome de la souris de façon stable, être exprimé et même être transféré aux générations futures. Ce processus consistant à modifier le génome de la souris par la micro-injection pronucléaire a été nommé transgénèse (8, 13).

Le développement des cellules souches embryonnaires a permis un développement accru de cette technique. C'est en 1981 qu'Evans et Kaufman ont prélevé les cellules souches embryonnaires d'un blastocyte pour les mettre en culture. Ils ont de ce fait créé des lignées de cellules souches embryonnaires pouvant s'intégrer dans les lignées de cellules germinales de façon efficace et reproductible (14). D'autres études menées par Martin et al. en 1981, ont conduit à l'isolation et à l'établissement de lignées cellulaires pluripotentes *in vitro* provenant d'un embryon de souris. Ces lignées cellulaires pluripotentes possédaient les propriétés des lignées cellulaires de tératocarcinomes (15). La disponibilité de ces cellules souches embryonnaires a eu une influence marquée sur la génétique du développement.

Le premier rapport relatant la manipulation génétique des cellules souches embryonnaires a été fait par Robertson et al. en 1986 (16). Celui-ci démontra qu'une fois intégré dans le génome, un rétrovirus pouvait être transmis par la lignée de cellules germinales. En 1987, Hooper et al. ainsi que Kuehn et al. ont manipulé des gènes endogènes en utilisant des cellules souches embryonnaires (17, 18). Ces études ont démontré qu'il était possible de manipuler génétiquement *in vitro* les cellules souches embryonnaires et d'intégrer ces mutations à la lignée de cellules germinales et ainsi créer des souris transgéniques (3).

Les bases étaient maintenant établies pour des expériences ciblant des mutations précises à des gènes spécifiques par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (3).

Aujourd'hui, de nombreuses lignées de souris transgéniques proviennent de la manipulation de cellules souches embryonnaires (19). Ces manipulations ciblées et conditionnelles, aussi nommées transgénése conditionnelle, utilisent des recombinaisons d'ADN telle que Cre et Flp. Ces recombinaisons vont déclencher l'expression de gènes de façon prédéterminée dans un temps prédéterminé. Ces nouvelles techniques permettent ainsi d'éviter les mortalités embryonnaires observées lors des mutations constitutives (3).

La publication récente de la séquence du génome humain a certainement apporté de nouveaux horizons en recherche biomédicale (20, 21). L'ère du séquençage du génome humain prend fin avec la venue d'une toute nouvelle ère, celle de la génomique fonctionnelle. Maintenant que la séquence du génome humain est connue, une tâche encore plus lourde attend la recherche, celle de l'étude de la fonction des milliers de

gènes composant le génome des mammifères. Cependant, la logistique et l'éthique impliquées dans l'utilisation de l'être humain en recherche nécessitent une alternative, soit un bon modèle expérimental.

La souris de laboratoire est depuis longtemps considérée comme le modèle expérimental par excellence dans les domaines de la génétique et du développement des mammifères. Quelques-unes de ses caractéristiques, notamment son temps de génération court (10 semaines) permettant environ cinq portées par an, sa petite taille, son grand nombre de petits par portée (3 à 9 souriceaux dépendamment de la lignée), son génome composé d'environ 3×10^9 paires de bases approximativement équivalent à celui de l'humain, lui ont valu ce titre (21, 22). Certaines estimations établissent le nombre de gènes à environ 20 000 dans le génome de la souris et de l'humain et la plupart des gènes humains semblent posséder une contrepartie dans le génome de la souris (21, 22).

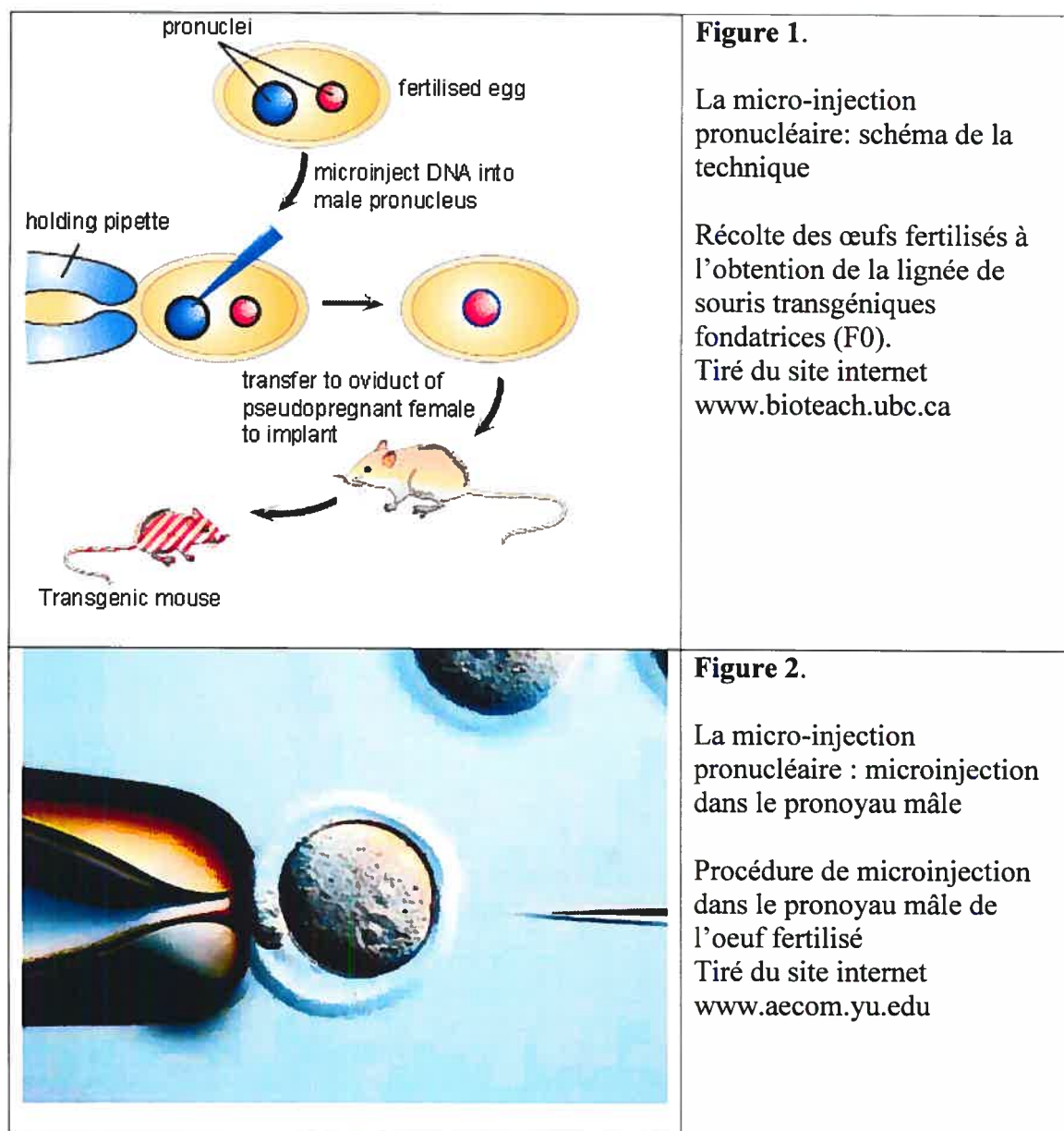
La souris est donc un organisme intéressant pour étudier la fonction des gènes et les maladies humaines d'origine génétique (23). Jusqu'à ce jour, la disponibilité de souris possédant des mutations génétiques dans une variété de systèmes a permis l'identification de la fonction de plusieurs gènes ainsi que l'élucidation et la caractérisation de plusieurs voies de signalisation cellulaire (23).

1.1.2 Création des souris transgéniques par la microinjection pronucléaire

1.1.2.1 La technique de microinjection pronucléaire

La technique qui a longtemps été préférée pour la création de souris transgéniques consiste en la micro-injection d'ADN dans le pronoyau d'un zygote en

développement (2). Cette technique conduit à l'insertion d'un ou de plusieurs transgènes au hasard dans le génome (2).



La Figure 1 schématise la technique de microinjection pronucléaire. Suite à la fertilisation de l'ovule, les pronoyaux mâle et femelle demeurent séparés pour quelques heures avant leur fusion et la formation du noyau du zygote (2). Cette période s'étend généralement sur 3 à 5 heures et est idéale pour la procédure de micro-injection (2). Les

pronoyaux peuvent être visualisés sous le microscope (Figure 2) et le transgène peut être injecté dans le pronoyau mâle qui est plus proéminent chez certaines lignées de souris. Par la suite, les membranes pronucléaires se brisent et les noyaux se fusionnent (2).

Les œufs ayant survécu au processus de micro-injection sont transférés dans l'oviducte de souris femelles pseudogestantes (2). Les techniques de PCR et de Southern blot sont utilisées pour vérifier l'intégrité du transgène. Les souris ayant intégré le transgène sont nommées fondatrices (F0) et seront utilisées pour former différentes lignées de souris transgéniques (2).

Puisque l'intégration du transgène dans le génome se fait de façon totalement aléatoire, les transgènes injectés auront tous un site d'insertion différent pour chacun des embryons manipulés. Ces différents sites d'insertion deviennent évidents à la première génération (F1) permettant ainsi l'établissement de lignées transgéniques indépendantes pour chacun des sites d'intégration (2).

Le mécanisme d'intégration du transgène dans le génome de la souris peut être divisé en deux étapes : la formation de concatémères et l'insertion chromosomale. Suite à l'injection dans le pronoyau, de multiples copies du transgène s'organisent dans une formation tandem tête-à-queue linéaire primaire nommée concatémère (9, 24). Cette formation concatémère, qui survient en premier, est suivie par son intégration dans le génome. Le site d'intégration chromosomique du transgène est déterminé de façon aléatoire. Celui-ci peut être secondaire à de rares événements comme celui d'un dommage à l'ADN survenant durant la phase S du cycle cellulaire (25, 26). Pour cette raison, il est rapporté que lorsque deux segments d'ADN sont injectés simultanément lors d'une même procédure, ceux-ci s'intègrent habituellement au même site

d'intégration dans le génome (27). Bien que rare, plus d'un site d'intégration du transgène dans le génome est aussi possible (28).

L'avantage de la micro-injection pronucléaire est qu'il s'agit d'une technique relativement simple pouvant être utilisée dans une grande variété d'organismes comme les plantes, les insectes, les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères (2). Le désavantage majeur de la micro-injection pronucléaire est sa basse efficacité dans la génération de souris transgéniques (29). Ainsi, 40 à 90% des ovocytes survivent à la procédure de micro-injection pronucléaire. De ces derniers, seulement 20% de ces embryons transférés se développent à terme (29). Environ 20% des embryons à naître seront des souris F0 pouvant être utilisées pour fonder des lignées transgéniques. La micro-injection pronucléaire est donc très peu efficace avec un taux de succès variant entre 1,6 à 3,25% (29).

1.1.2.2 Facteurs qui influencent le phénotype d'une souris transgénique

Un transgène intégré de façon stable dans le génome va être transmis de façon mendélienne. Par contre, une variation dans le ratio mendelien prévu peut être engendrée par une lignée germinale mosaïque chez la génération F1(2). Une lignée germinale mosaïque est caractérisée par l'intégration du transgène dans une fraction des cellules germinales seulement. Une variation dans le ratio mendelien peut également être observée lorsque de multiples sites d'insertion du transgène sont présents (2). Bien que le phénotype d'un organisme transgénique soit influencé par plusieurs facteurs génétiques et environnementaux, l'expression du transgène ainsi que le patron d'expression sont avant tout liés à la construction du transgène lui-même (2).

Le contrôle transcriptionnel d'un gène se situe dans le promoteur de ce gène ainsi que dans d'autres éléments régulateurs localisés en amont ou en aval de la séquence (2). Le promoteur est, sans aucun doute, le mécanisme de contrôle le mieux caractérisé. Ce dernier se localise habituellement immédiatement en amont du site de transcription (2). L'expression du gène d'intérêt dans le transgène peut être sous le contrôle du promoteur même de ce gène ou de celui d'un promoteur hétérogène. Certains promoteurs peuvent être spécifiques pour un tissu ou un type cellulaire particulier, d'autres seront exprimés de façon large dans une variété de tissus ou de types cellulaires (2). Ainsi, le promoteur est un facteur important à considérer dans l'analyse du phénotype observé chez les souris transgéniques.

D'autres facteurs faisant varier la transcription d'un gène sont les amplificateurs. Un amplificateur est une séquence d'ADN qui stimule la transcription. Cet amplificateur peut potentialiser l'activité d'un gène dans un tissu ou un type cellulaire particulier en liant et activant les facteurs de transcription (30).

L'expression du transgène injecté par micro-injection pronucléaire est hautement variable entre les différentes lignées de souris transgéniques générées (29). La variation dans l'expression de ce transgène est en partie due au fait que les sites d'intégration du transgène sont aléatoires dans le génome (29). Cette variation d'expression reliée à la localisation du site d'intégration dans le génome peut être expliquée par plusieurs phénomènes comme l'insertion du transgène à proximité d'un élément du contrôle transcriptionnel d'un gène endogène, l'insertion du transgène dans une région transcriptionnellement inactive ou encore, dans une région sur l'un des chromosomes sexuels. Ainsi, par exemple, l'expression d'un transgène localisé dans

une région inactive au point de vue transcriptionnel pourrait résulter en une absence d'expression du transgène en question (29).

Dans le but de contrecarrer le phénomène de l'insertion dans une région du génome inactive transcriptionnellement, l'addition d'un élément *cis* comme celui de la région contrôle (LCR) ou S/MARS est utilisée (2). Les LCR sont des séquences régulatrices qui contrôlent la disponibilité de l'ADN pour les facteurs de transcription. Les séquences régulatrices peuvent être localisées à des dizaines de kilobases de la région codante (2).

Le nombre de copies d'un concatémère de transgène inséré dans le génome varie beaucoup (31-34). Il n'y a habituellement pas de corrélation observée entre le nombre de copies du transgène inséré et les niveaux d'expression mesurés du transgène. Une exception à cette règle se produit lorsque le transgène possède un élément amplificateur comme le LCR décrit précédemment. Dans ce cas, l'expression du transgène va être directement proportionnel au nombre de copies insérées (35, 36).

Une forme d'atténuation du niveau d'expression du transgène est observée occasionnellement lorsqu'un grand nombre de copies est inséré. De larges séquences organisées en tandem et ne possédant pas une structure de chromatine adéquate peuvent simplement réprimer la transcription du transgène (35, 36).

Une autre forme d'atténuation de l'expression du transgène a été découverte de façon inattendue dans l'étude de plantes, champignons et plus récemment chez la drosophile. Cette atténuation de l'expression résulterait de l'interaction entre un gène endogène homologue et le transgène (37-39). Dans cette interaction aussi nommé co-suppression, le transgène peut inactiver une contrepartie endogène ou un autre transgène

similaire dans une autre location génomique. Chez la drosophile, il a également été démontré que l'atténuation progressive de l'expression en rapport avec l'augmentation du nombre de copies peut refléter un effet biologique agissant comme mécanisme de régulation contre un nombre trop grand de copies d'un gène particulier (39).

L'intégration du transgène dans le génome de l'hôte conduit à un dérangement local dans l'ADN chromosomique au site d'insertion. Plus souvent qu'autrement, le gène va s'insérer dans un site inactif et son intégration n'entraînera aucun problème. Cependant, l'intégration du transgène peut aussi entraîner un dérangement crucial de l'ADN chromosomique au site d'insertion et le résultat peut être ce qui est nommé le phénomène de mutation insertionnelle (40). Les mutations insertionnelles ont une fréquence se situant entre 5 à 10% chez les souris créées par micro-injection pronucléaire (40-43). Ces mutations sont habituellement récessives et ont l'unique propriété d'être marquées au niveau moléculaire par la séquence du transgène. Il est donc possible de cloner les séquences d'ADN chromosomique localisées aux marges du site d'insertion en utilisant des oligonucléotides correspondant au transgène (42, 44). En ce faisant, il est occasionnellement possible de déterminer précisément la région du génome impliquée par l'insertion du transgène et d'identifier le gène affecté.

Le transgène inséré dans le génome développe des fonctions en relation avec plusieurs autres gènes de la cellule. Il y a donc un réseau complexe d'interactions entre le transgène et les gènes endogènes (29). Ainsi, le bagage génétique aussi nommé modificateur, consiste en 99.9% des 20 000 gènes qui constituent le génome (45). Ce bagage génétique interagit avec la mutation génique et influence ainsi le phénotype observé (45). Donc, certaines caractéristiques du phénotype peuvent être évidentes dans

une souche cosanguine et être atténuées ou amplifiées dans une autre lignée possédant un bagage génétique différent (29, 45).

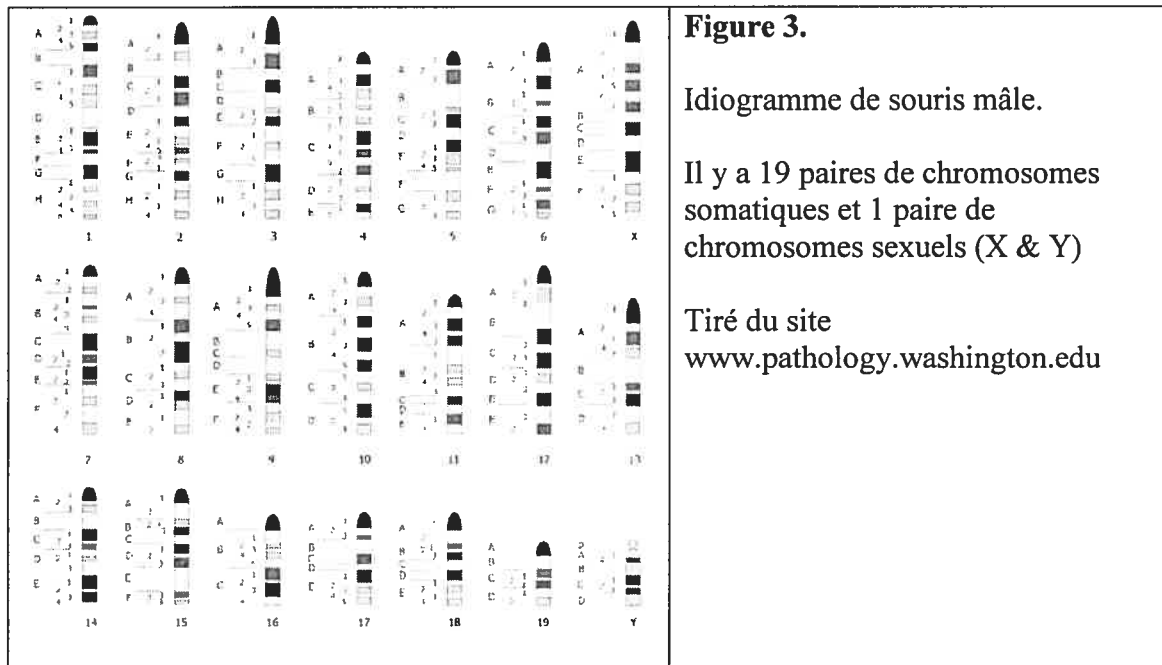
Plusieurs autres facteurs peuvent influencer le phénotype d'une souris transgénique, notamment son environnement et le statut sanitaire de la colonie. La présence de maladies infectieuses et de problèmes environnementaux peut intervenir et faire varier le phénotype de la souris mutante (45). Ainsi, par exemple, une souris possédant une mutation quelconque peut réagir d'une façon totalement inattendue ou inappropriée à un agent infectieux ou à une bactérie opportuniste (45). D'autres facteurs environnementaux pouvant avoir une influence sur le phénotype observé incluent: la luminosité et l'humidité, la présence de phytoestrogènes ou d'autres disrupteurs endocriniens dans la nourriture, la présence d'acides, de chlore ou d'antibiotiques dans l'eau de boisson ainsi que plusieurs autres facteurs liés à la régie comme le niveau de bruit, le nombre d'animaux par cage, la grandeur des cages et la litière utilisée (45).

1.1.3 Identification du site d'intégration du transgène dans le génome

1.1.3.1 L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Plusieurs techniques sont disponibles pour identifier le site d'intégration du transgène. Une technique pouvant contribuer à identifier le site d'intégration et préciser le nombre de sites d'intégration se nomme hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Dans cette technique, des chromosomes en métaphase sont préalablement étalés sur une lame. Ces chromosomes sont ensuite colorés avec le Giemsa. La coloration au Giemsa va créer une alternance de bandes claires et foncées nommées bandes G. Ces bandes G permettent d'identifier clairement chacun des chromosomes de l'idiogramme (Figure 3).

Les belles métaphases comportant le bon nombre de chromosomes sont identifiées, localisées sur les lames et photographiées.



Le principe de base de l'hybridation *in situ* en fluorescence est simple : un simple brin d'ADN va tendre à se lier à sa séquence complémentaire (46). Donc, une sonde d'ADN possédant une séquence spécifique va reconnaître et se lier à sa séquence complémentaire sur un chromosome en métaphase. Dans cette technique, la sonde se lie à l'ADN cible sous des conditions permettant de retrouver une conformation double brin. Dans le but de retrouver la sonde, une molécule d'haptène est attachée à celle-ci. Cette dernière molécule peut être marquée de façon indirecte par un anticorps marqué avec la fluorescéine (46). La sonde peut donc finalement être observée sur sa cible utilisant un microscope à fluorescence. Le résultat de la fluorescence est comparé à l'étalement de chromosomes colorés au Giemsa et démontrant les bandes G. L'emplacement et le nombre de signaux fluorescents peuvent donc être identifiés (46).

1.1.3.2 Le « Universal GenomeWalker »

La seconde technique, modifiée dans ce cas pour permettre l'identification du site d'intégration du transgène, utilise une trousse de clonage d'ADN, le « Universal GenomeWalker Kit » (BD Biosciences Clonthech, Ca, USA). L'adaptation de cette technique est décrite dans l'annexe 6. Cet ensemble fournit une technique basée sur l'amplification par réaction par polymérase en chaîne (PCR) et permet de trouver une séquence d'ADN inconnue en utilisant une séquence d'ADN connue. L'ADN est premièrement extrait à partir d'un tissu (rate) en utilisant des méthodes standards d'extraction (43). Des enzymes de restriction sont ensuite sélectionnées afin qu'elles ne coupent pas dans le transgène lui-même (43). Des oligonucléotides spécifiques pour le transgène sont générés et l'amplification par PCR est exécutée (43). À cette étape, la réaction par PCR vise à amplifier un court segment du transgène avec un segment d'ADN génomique. La génération de mini-librairies, la migration sur un gel d'agarose et l'identification des bandes représentatives sont ensuite faites. Les bandes représentatives sont séquencées et les séquences sont comparées à des banques de données publiques localisant ainsi le segment amplifié précisément dans le génome (43).

1.2 L'étude du système reproducteur

1.2.1 Développement embryonnaire des gonades

1.2.1.1 Étapes de détermination du sexe

Le dimorphisme sexuel est une loi commune à plusieurs espèces animales; cependant les mécanismes biologiques de détermination du sexe peuvent être différents d'une espèce à l'autre. Le principal facteur déterminant est d'ordre génétique chez la plupart des mammifères (47) et dépend de la présence ou non du chromosome Y.

Lorsque le chromosome Y est présent, le sexe sera masculin; si absent, le sexe sera féminin (47).

De plus, le seul gène d'importance pour la détermination du sexe sur le chromosome Y est le gène *SRY* (Sex Determining Region on Y chromosome) (48). Ce gène est présent chez la plupart des mammifères. Chez la souris, le gène *Sry* code pour une protéine se liant à l'ADN (48). Cette protéine va régulariser l'expression d'un ensemble de gènes, déterminant ainsi le phénotype de la crête génitale (47).

Plusieurs études chez la souris ont confirmé qu'il y a une période précise dans le développement des gonades où l'expression du gène *SRY* va assurer le développement des testicules. Ainsi, si le gène *SRY* n'atteint pas un niveau d'expression requis à un moment bien particulier dans le développement des gonades, il y aura un délai dans le développement des testicules et ainsi, le développement des ovaires sera amorcé (47).

Des études chez la souris ont également démontré que chez le mâle, le gène *Sry* est exprimé seulement dans la crête génitale commençant autour du jour 10,5 de l'embryogénèse (49). Les niveaux de transcription atteignent un pic au jour 11,5 de l'embryogénèse et déclinent au jour 12,5 (49). En ce faisant, l'expression de *SRY* initie la différenciation des gonades en testicules, mais ne semble pas impliquée dans le développement subséquent de l'organe et dans le maintien de l'expression des gènes spécifiques au testicule (49). Dans le testicule, l'action de *SRY* est possiblement celle d'enclencher la différenciation des cellules pre-Sertoli à partir d'un pool cellulaire. Ces cellules pre-Sertoli seraient par la suite directement responsables du développement des autres lignées cellulaires dans les tubules séminifères (47).

1.2.1.2 Développement embryonnaire du testicule

La première évidence du développement sexuel se situe dans l'apparition des cellules germinales primordiales dans les stades précoces suivant l'implantation de l'embryon (50). Ces cellules peuvent être identifiées sur la base de leur localisation, de leur morphologie et la présence intracytoplasmique de la phosphatase alcaline (50). Environ 50 de ces cellules présumées être des précurseurs des cellules primordiales sont observées autour des jours 7-7.5 post-conception (p.c.) dans la composante mésodermique des membranes vitellines(50). Entre les jours 7.5 et 8 p.c., 150 de ces cellules démontrent une activité de la phosphatase alcaline. Au jour 8 p.c., ces cellules vont débiter une migration à partir des membranes vitellines vers l'allantoïde et de là, elles vont migrer pour atteindre la crête génitale (50). La crête génitale est un renflement longitudinal qui apparaît ventro-médialement par rapport à la crête urinaire primitive (50). La crête génitale constitue à ce moment l'ébauche gonadique primitive et sa colonisation par des cellules germinales est essentielle au développement futur des gonades (50). Chez la souris, la crête génitale demeure morphologiquement indifférenciée entre les deux sexes jusqu'au jour 12.5 p.c. (47, 51).

Le testicule en développement est composé de quatre lignées cellulaires (51). Ces lignées cellulaires sont constituées de cellules germinales primordiales migrant à la crête génitale entre le jour 10 et le jour 11 p.c. comme décrit précédemment, et de trois lignées de cellules somatiques: 1) les précurseurs des cellules de Sertoli (pre-Sertoli); 2) les précurseurs des cellules de Leydig; 3) les cellules mésenchymateuses incluant les cellules donnant naissance aux cellules myoïdes périvitellaires ainsi qu'aux cellules du stroma (51). Entre les jours 12.5 et 13.5 p.c., le testicule en développement revêt une

apparence zébrée due à l'alignement des cellules pre-Sertoli et des cellules germinales primordiales (50). C'est à ce moment que les cellules mésenchymateuses s'organisent avec les cellules germinales primordiales et forment les cordons testiculaires. Ces cordons testiculaires se retrouvent entourés par une membrane basale (47). Par la suite, les cellules germinales mâles entrent en arrêt mitotique au jour 14 p.c. et demeurent dans cet état jusqu'à la naissance (47). Le testicule prend du volume principalement entre les jours 13 et 17 p.c. (51).

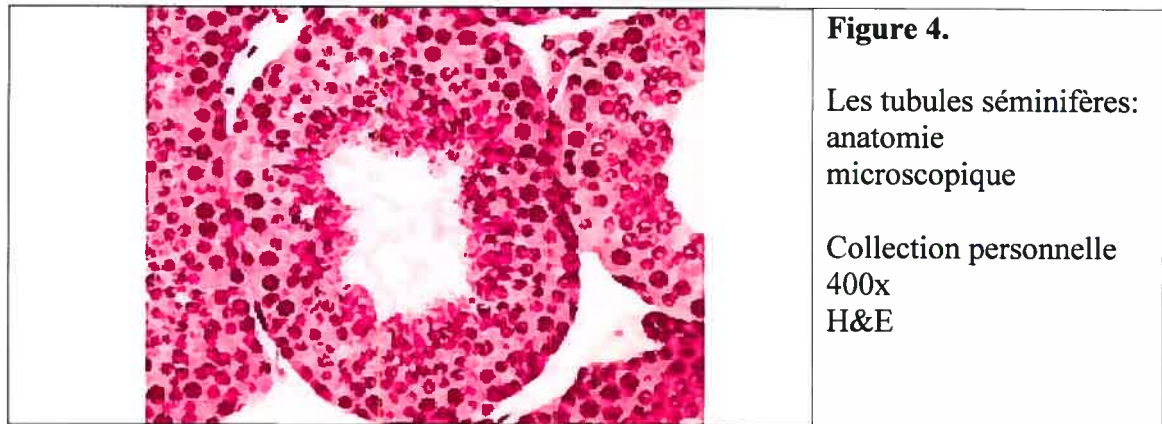
La région médullaire du testicule est occupée par des cellules mésenchymateuses organisées de façon lâche. La paroi des tubules séminifères est bordée par des cellules rondes représentant les cellules pre-Sertoli (51). Les cellules germinales (pré-spermatogéniques) sont localisées vers le centre des cordons testiculaires contournés (51).

1.2.2 Développement postnatal du testicule

1.2.2.1 L'épithélium germinale

La spermatogenèse chez la souris débute tôt après la naissance. L'établissement de la spermatogenèse requiert la préservation d'un groupe de cellules souches et d'un groupe de spermatogonies acquérant le pouvoir de se différencier en spermatides (51). Le premier cycle spermatogénique procède par les mêmes stades de développement que les cycles subséquents. La transformation de la cellule souche en une spermatogonie de type A se produit au moment où la spermatogenèse est initiée. La première vague de spermatogonies est observée à 3-4 jours d'âge (51). Les premiers spermatocytes primaires apparaissent ainsi entre 8-10 jours d'âge (51). Subséquemment, les

spermatocytes subissent leurs stades successifs de division méiotique et de différenciation en spermatides (51).



Bien que la spermatogenèse soit amorcée tôt après la naissance, les spermatides matures ne sont pas présents avant la puberté (52, 53). Une lumière fait son apparition dans les tubules séminifères à 14 jours d'âge (51). La Figure 4 schématise une coupe transversale de l'épithélium germinale d'un animal pubère. L'épithélium germinale contient toutes les étapes de différenciation des spermatogonies jusqu'aux spermatides allongés.

1.2.2.2 Formation de la barrière hémato-testiculaire et ses rôles

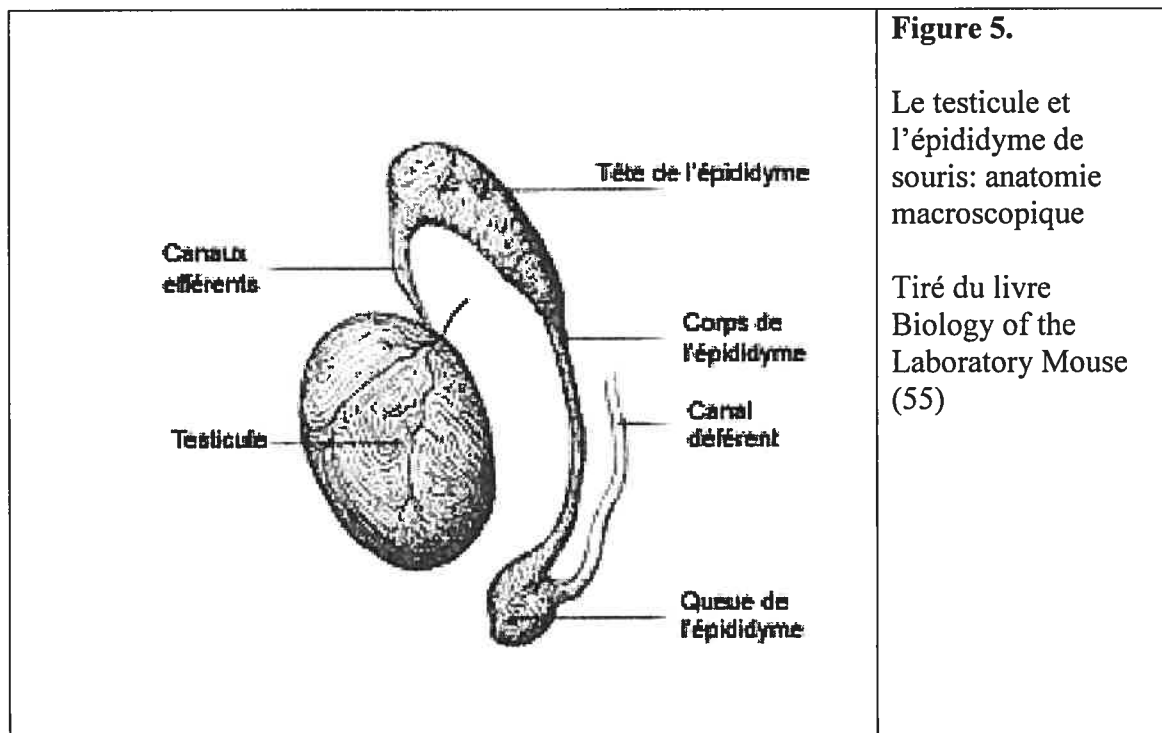
Plusieurs changements morphologiques se produisent dans la différenciation post-natale des cellules de Sertoli. Notamment, la formation de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli adjacentes est d'importance capitale dans l'établissement de la barrière hémato-testiculaire (51). Ces jonctions peuvent être observées entre 10 et 16 jours d'âge (51, 52). Il en résulte ainsi deux zones dans l'épithélium, une zone basale dans laquelle sont alignées les spermatogonies et un compartiment adluminal où se développent les cellules de tous les autres stades de la spermatogenèse (51, 52).

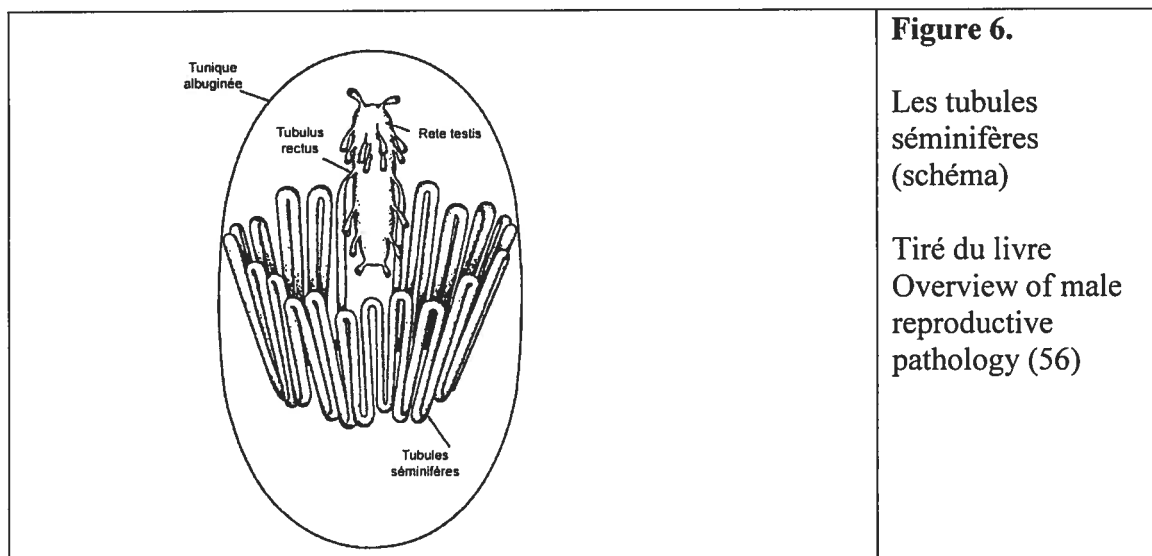
La barrière hémato-testiculaire est sélectivement perméable à plusieurs substances leur permettant ainsi d'atteindre le compartiment adluminale du tubule (53). Les substances passant la barrière hémato-testiculaire sont habituellement détectées dans des quantités beaucoup plus faibles que celles retrouvées dans le sang (53). Cette barrière hémato-testiculaire fonctionne également comme une barrière immunologique. Elle empêche le contact entre le système immunitaire et les autoantigènes à la surface des spermatocytes et des spermatides (54).

1.2.3 Puberté

1.2.3.1 Morphologie du testicule adulte

La Figure 5 schématise l'anatomie macroscopique du testicule et des canaux excréteurs chez la souris. Chez l'adulte, les testicules sont recouverts par une capsule fibreuse, la tunique albuginée (52), de laquelle s'étendent de nombreuses trabécules de tissu fibreux (51).





Dans le testicule, deux compartiments anatomiques majeurs peuvent être discernés; le compartiment interstitiel et le compartiment formé par les tubules séminifères. Le compartiment interstitiel contient les cellules interstitielles, ou de Leydig ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques, des fibres nerveuses et des macrophages (51). La majeure partie du volume du testicule est occupée par seulement quelques tubules séminifères formant de nombreuses circonvolutions (Figure 6)(55). L'épithélium séminifère contient les cellules de Sertoli ainsi que plusieurs générations de cellules germinales. Les cellules de Sertoli sont cylindriques hautes et s'étendent de la membrane basale à la lumière tubulaire et forment ainsi la composante structurale de l'épithélium séminifère (51, 56). Ces cellules ont aussi pour fonction de nourrir les cellules germinales et de maintenir la spermatogenèse (52, 56). Le noyau des cellules de Sertoli est irrégulier et ovale. Il tend à changer de position dans la cellule à différent stade du cycle spermatogénique (53).

Chacune des extrémités des tubules séminifères est connectée au rete testis. Pour une courte distance avant d'arriver au rete testis, l'épithélium fait une transition très

abrupte vers un épithélium simple cubique (56). Cette région est constituée de tubules droits. Ces tubules sont confluent avec le rete testis qui est composé d'un réseau de tubules sous-capsulaires (chez la souris) localisés dans la région dorso-caudale du testicule (56). Chez la souris, le rete testis est localisé immédiatement sous la tunique albuginée (Figure 7)(57). La fonction principale du rete testis est la réabsorption des fluides sécrétés par le testicule. Il possède également un rôle dans la modulation de l'estrogène (52).

Le rete testis est situé près de l'entrée de l'artère testiculaire qui est une branche de l'aorte abdominale (52). Près de chaque testicule, l'artère testiculaire devient convolutive et est entourée par le plexus pampiniforme veineux. Ce réseau artério-veineux fonctionne comme un échangeur de chaleur efficace, maintenant le testicule à une température inférieure au reste du corps (52).



Figure 7.

Le rete testis: anatomie microscopique

Le rete testis (flèche) est bordé d'un épithélium simple plat.

Collection personnelle
H&E

1.2.3.2 Spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus de développement d'une spermatogonie en spermatide allongé (53). La Figure 8 schématise la spermatogenèse avec toutes les

étapes de développement et de différenciation des cellules germinales. L'épithélium germinal contient plusieurs cellules souches nommées spermatogonies. Ces spermatogonies se multiplient par mitose dans le but de conserver le pool de spermatogonies de type A mais aussi pour créer des spermatogonies de type B qui vont se différencier en spermatides (53). La spermatogonie de type B se divise par mitose pour donner naissance à deux spermatocytes primaires (53).

Un spermatocyte primaire nouvellement formé subit une première division méiotique et quitte la zone basale de l'épithélium pour se retrouver dans la zone adluminale en rompant transitoirement les complexes jonctionnels des cellules de Sertoli (53). Chaque spermatocyte primaire va donner deux spermatocytes secondaires durant la méiose I (Figure 8). Ces spermatocytes secondaires possèdent un nombre tétraploïde de chromosomes ($4N$) et sont ensuite transformés, lors de la méiose II, en spermatides ronds qui eux possèdent un nombre haploïde ($1N$) de chromosomes (53). La deuxième division méiotique est très rapide et donc très difficile à observer histologiquement (53, 58).

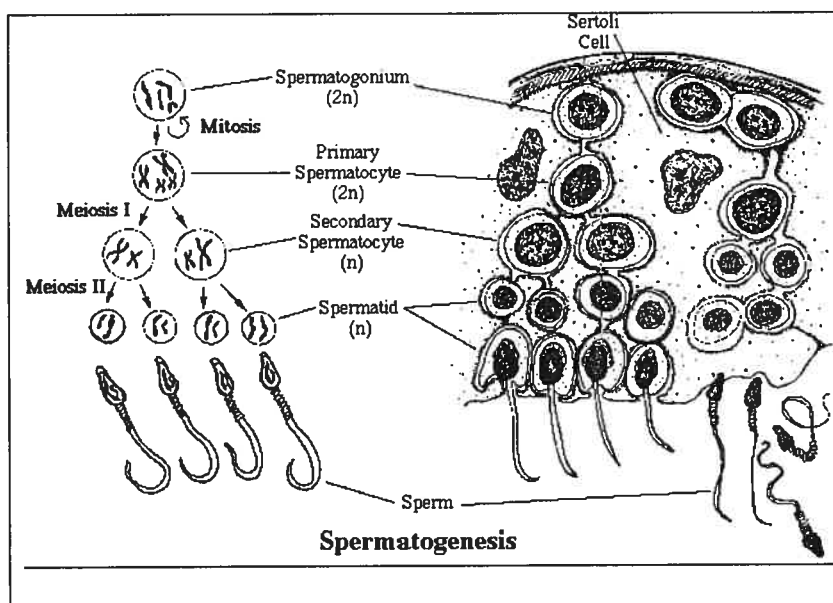


Figure 8.

La spermatogénèse (schema)

Tiré du site internet
www.luc.edu/depts/biology

Dans une région prédéterminée d'un tubule séminifère, un cycle complet de changement se produit sur 8,6 jours (53). Les douze premières étapes de développement des spermatides donnent leur nom aux stades des cycles un à douze (53). Les stades sont déterminés par le développement de l'acrosome sur le spermatide rond ou par la forme du noyau sur le spermatide allongé (53). Les spermatides à l'étape de développement treize se situent dans le stade I de développement du cycle spermatogénique (Figure 9). Normalement, aucun stade du cycle spermatogénique ne contient plus d'une génération de spermatides allongés. Les spermatides matures sont relâchés avant l'apparition de la nouvelle génération de spermatides allongés au stade VIII du cycle spermatogénique (53, 57).

1.2.4 Canaux excréteurs

1.2.4.1 Développement embryonnaire des canaux mésonephrotiques

Le mésonephron contient deux types de canaux : le canal mesonéphrotique aussi nommé canal de Wolff et dérivé du canal pronéphrotique, et le canal paramesonéphrotique aussi nommé canal de Müller originant d'une invagination de l'épithélium coelomique (47). La différenciation des canaux mesonéphrotiques est dépendante des androgènes sécrétés par les cellules de Leydig embryonnaires (47). Chez la femelle, chez qui les androgènes sont absents durant cette période du développement, les canaux mesonéphrotiques dégénèrent autour du jour 15 du développement embryonnaire (47).

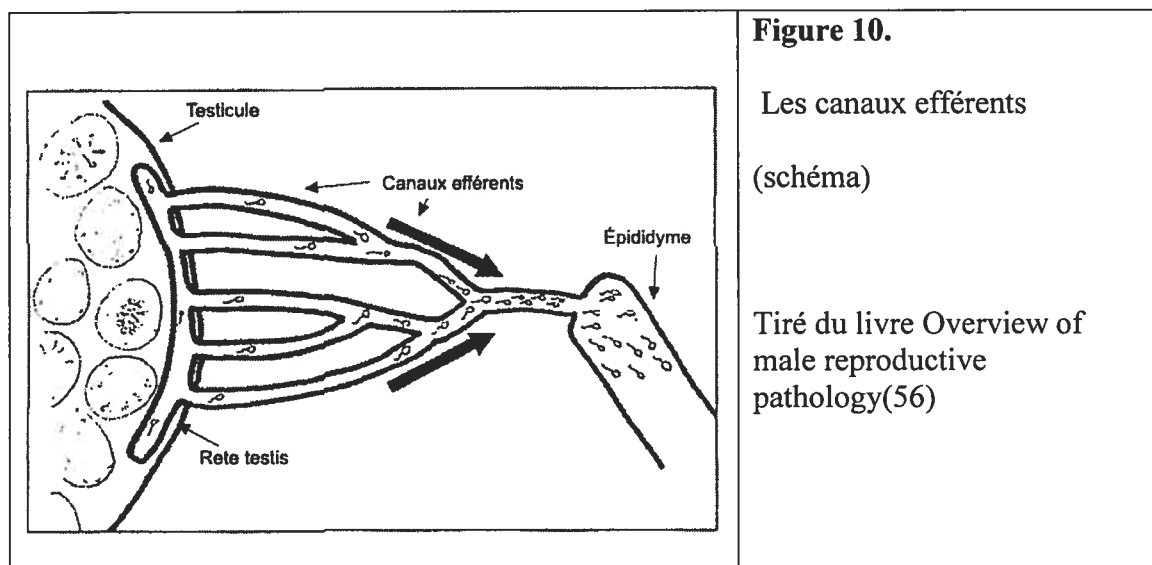
Chez le mâle, les canaux de Wolff forment les canaux excréteurs (canaux efférents, épидидymes et canaux déférents) et les vésicules séminales (47, 59). Les cellules pre-Sertoli vont produire un facteur de croissance de la famille du transforming

growth factor- β (TGF- β), l'hormone anti-Muëllerienne, en réponse à l'expression du gène *SRY*. Cette hormone va induire la dégénérescence des canaux de Müller ou paramésonephrotiques chez le mâle (47).

Les canaux efférents ainsi que la tête de l'épididyme originent des tubules mésonephrotiques proximaux. L'épididyme et le canal déférent originent du segment médian du canal mésonephrotique tandis que les vésicules séminales originent du segment caudal de ce même conduit (60).

1.2.4.2 Développement postnatal des canaux excréteurs

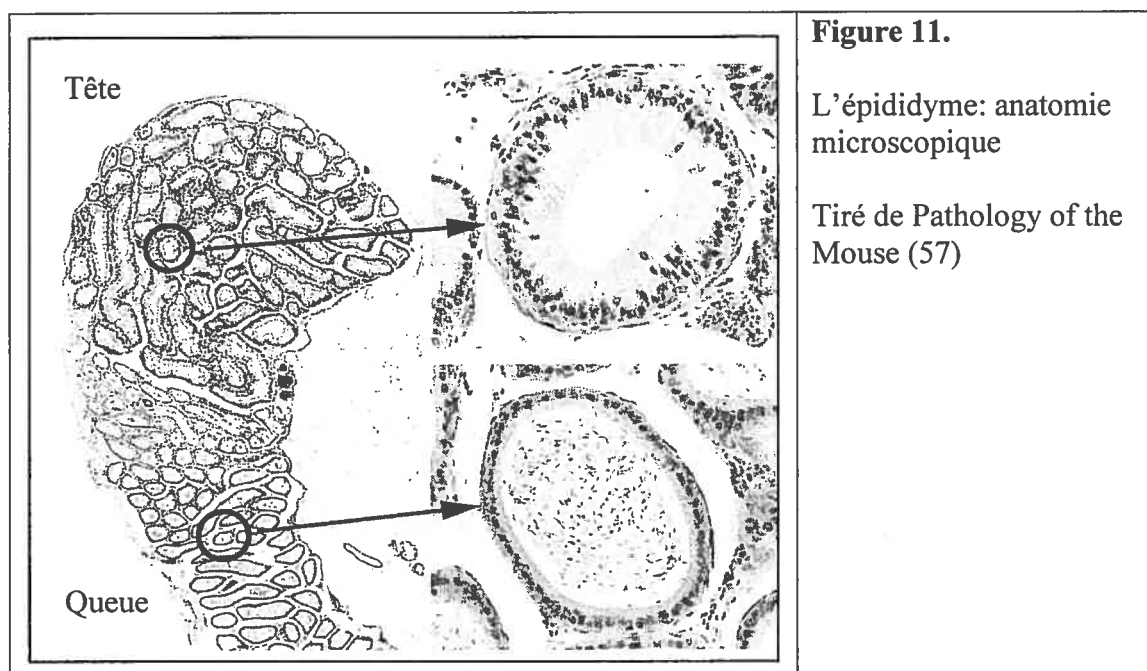
Le rete testis connecte les deux extrémités des tubules séminifères à une chambre collectrice localisée sous la tunique albuginée (59). Chez la souris, la chambre collectrice est connectée à trois à sept canaux efférents (59). La figure 10 schématise les jonctions entre le rete testis et les canaux efférents ainsi que la jonction entre le canal efférent commun et l'épididyme. La première partie des canaux efférents est courte, légèrement convolutive, localisée dans le ligament épидидymal supérieur (59) et entourée de tissu adipeux (52, 59). La seconde partie comporte des convolutions plus prononcées et est entourée de tissu fibreux en continuité avec l'épididyme (56, 59). La lumière des canaux efférents est irrégulière car les canaux sont bordés d'un épithélium simple qui varie en hauteur de cubique à cylindrique. Ces canaux sont entourés par une quantité variable de fibres musculaires lisses (56, 59). Chez la souris, les canaux efférents s'anastomosent pour former un canal unique (le canal efférent commun) qui change de façon abrupte en segment initial de l'épididyme (Figure 10) (56, 59).



Les canaux efférents sont bordés par un épithélium pseudostratifié cylindrique composé de cellules ciliées, de cellules non-ciliées, de quelques cellules basales ainsi que de quelques lymphocytes et macrophages intraépithéliaux (59). Les fonctions des canaux efférents sont principalement le transport du liquide séminal et la réabsorption des fluides. Les canaux efférents réabsorbent 90% des fluides sécrétés par le testicule (56).

L'épididyme consiste en un long tubule convoluté qui est divisé en trois parties principales : la tête, le corps et la queue (56). Il y a un changement abrupt du revêtement épithélial entre le canal efférent et le segment initial de l'épididyme (56). La tête de l'épididyme est entourée de tissu adipeux (52). Sur sa longueur, la hauteur de son épithélium pseudostratifié cylindrique est inversement proportionnelle au diamètre de la lumière tubulaire. Ainsi, les portions du tubule ayant le plus petit diamètre sont bordées par l'épithélium le plus haut dans la tête de l'épididyme (Figure 11)(57). Le diamètre tubulaire est maximal dans la queue de l'épididyme ou l'épithélium est aussi le plus bas

(52). Les cellules bordant l'épididyme ont une bordure en brosse et quelques-unes possèdent des stéréocils (56).



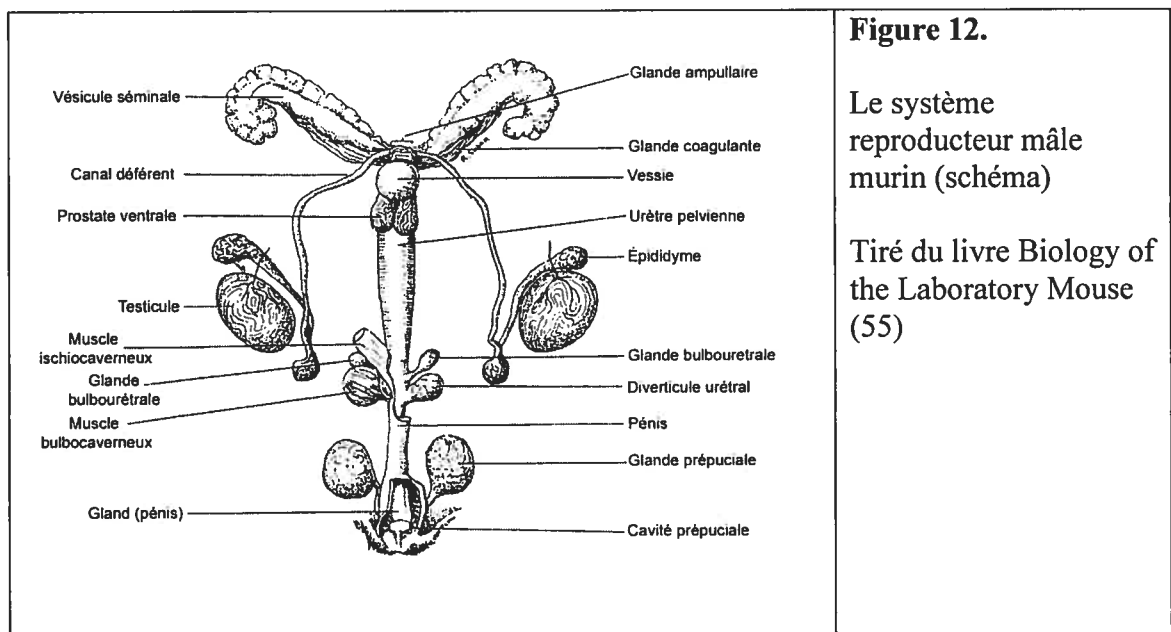
Sur le pôle crânial de l'épididyme est localisé un petit segment ovale sessile nommé l'appendice testiculaire. Cet appendice semble dériver des canaux de Müller (51).

1.2.4.3 Particularités physiologiques des canaux excréteurs

L'épididyme possède des fonctions de sécrétion et d'absorption des fluides du testicule ainsi qu'une fonction de stockage des spermatozoïdes matures (61). Il possède également une barrière hémato-épididymale ainsi qu'un microenvironnement essentiel à la maturation et à la capacitation des spermatozoïdes (61). Chez la souris, ces fonctions sont dépendantes des androgènes circulants et des facteurs testiculaires présents dans les fluides (56, 61).

1.2.5 Glandes accessoires

Chez la souris comme chez plusieurs mammifères, le système reproducteur mâle comprend plusieurs glandes accessoires (Figure 12)(55). Les plus imposantes sont les vésicules séminales localisées dans la cavité abdominale (51). La partie concave des vésicules séminales est bordée par les glandes coagulantes (51). Bordant chaque côté de l'urètre pelvienne, le complexe prostatique se compose de la prostate ventrale et de la prostate dorsolatérale (51). Dans la partie caudale de la cavité pelvienne, il y a une paire de glandes bulbouretrales, communément nommées glandes de Cowper, localisées de chaque côté de l'urètre (51). Finalement, une paire de glandes prépucciales sont localisées dans les tissus sous-cutanés de la région périnéale (51).



1.2.5.1 Origines embryonnaires des glandes accessoires

Le développement des glandes accessoires chez la souris suit le même patron que celui retrouvé chez la plupart des mammifères (51). Le complexe prostatique, constitué de la prostate ventrale et dorsolatérale, origine du sinus urogénital (51). Chez

la souris, comme chez les autres espèces, le parenchyme du complexe prostatique est dérivé des bourgeons prostatiques (51). Ces bourgeons sont des excroissances épithéliales qui émergent des sinus génito-urétraux sous la vessie et croissent dans le parenchyme avoisinant (51). Chez l'embryon, les bourgeons prostatiques apparaissent tard le jour 17 p.c. (51). Sur l'aspect ventral du sinus urogénital, 1 à 3 canaux par côté sont observés. Entre 20 à 25 canaux par côté émergent de l'aspect dorsolatéral. Ces deux groupes de canaux développent en lobes ventraux et dorsolatéraux respectivement (51). Les glandes coagulantes (aussi nommés prostate antérieure (57)) émergent de deux gros bourgeons qui croissent caudalement dans le mésenchyme situé dans la partie concave des vésicules séminales (50, 51). Les vésicules séminales originent de la partie caudale des canaux mésonéphrotiques (51).

1.2.5.2 Développement postnatal des glandes accessoires

Chez la souris, l'embranchement des bourgeons prostatiques se produit principalement après la naissance (51). Le patron d'embranchement est distinctif pour chacun des lobes. Les bourgeons de la prostate dorsale et ventrale s'allongent dans le mésenchyme du sinus uretro-génital et subissent un embranchement dichotomique extensif (51). L'apparence des glandes accessoires évolue graduellement jusqu'à 4 semaines d'âge (51).

1.2.5.3 Morphologie des glandes accessoires adultes

Chez la souris, les canaux prostatiques sont organisés et encapsulés dans des lobes individuels localisés dans des positions spécifiques autour de l'urètre sans toutefois l'entourer complètement (51). La prostate de la souris est particulière en ce fait

qu'elle ne possède pas d'acini réels et est composée d'une série de canaux. Chacun des lobes a des embranchements distinctifs (51).

Dans la prostate, la partie glandulaire est bordée par un épithélium cylindrique bas composé de cellules sécrétrices entremêlées de cellules basales (51). Les glandes coagulantes (ou prostate antérieure) sont allongées et possèdent une apparence translucide et brillante (57). Ces glandes forment des structures minces et courbes localisées dans la partie concave des vésicules séminales où elles sont fixées par du tissu conjonctif (51) (Figure 12)(55). Les tubules des glandes coagulantes sont bordés par un épithélium cylindrique simple contenant des cellules sécrétrices hautes ainsi que des cellules basales triangulaires (51). Chacune des glandes coagulantes a deux canaux excréteurs qui entrent dans la paroi dorsale du col de la vessie (51). Typiquement, les sécrétions de la prostate et des glandes coagulantes ne sont pas autant intensément éosinophiliques à la coloration H&E que celles des vésicules séminales (52).

Les vésicules séminales sont grosses, pairées et sont localisées dorsolatéralement à la vessie dans la cavité péritonéale (52). La surface interne est divisée en petites régions par un système de crêtes primaires, secondaires et tertiaires formées de tissu conjonctif et bordées d'un épithélium cylindrique. Cet épithélium est composé de cellules sécrétrices hautes possédant un noyau localisé dans le tiers supérieur de la cellule, et de petites cellules basales (51). La sécrétion intraluminal des vésicules séminales est intensément éosinophilique à la coloration H&E (52).

Les glandes bulbo-urétrales sont pairées et composées de glandes tubulo-alvéolaires (51). Le corps de chacune des glandes est couvert en partie par le muscle bulbocaverneux (*musculus bulbocavernosus*). Le tissu conjonctif interlobulaire est

pauvrement développé (51). Un canal principal simple draine chacun des lobes. Les canaux glandulaires et les alvéoles sont bordés par un épithélium cylindrique haut entremêlé de cellules basales (51).

1.2.6 Physiologie du système reproducteur mâle

1.2.6.1 Contrôle hormonal du système reproducteur mâle

Le processus de spermatogenèse ainsi que tous les autres aspects de la fonction reproductrice mâle dépendent de la présence d'hormones produites par l'hypothalamus, l'hypophyse et par le testicule formant ainsi l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadal (53).

Certains neurones de l'hypothalamus relâchent la gonadolibérine (GnRH) dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire. La GnRH voyage jusqu'à l'hypophyse et module la sécrétion des hormones gonadotropes (53).

Les cellules gonadotropes de l'hypophyse répondent à la GnRH en produisant de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ces hormones connues sous le titre de gonadotropines sont relâchées dans la circulation sanguine pour aller interagir avec leurs cellules cibles respectives (53).

L'hormone lutéinisante ou LH est une hormone glycoprotéinique de la famille de protéines de TGF- β (53). Elle a un effet indirect sur la spermatogenèse via la stimulation des cellules de Leydig (53). Les cellules de Leydig possèdent un récepteur de surface pour la LH et répondent à la stimulation en produisant et en relâchant la testostérone (53). La testostérone est soit diffusée directement dans les tubules séminifères ou est liée à un transporteur comme l'albumine lui permettant ainsi de voyager dans les systèmes lymphatiques et sanguins (53).

La testostérone et ses métabolites, la dihydroxytestostérone (DHT) et l'estradiol (E2), sont appelés hormones sexuelles stéroïdiennes (62). Ces hormones sont directement impliquées dans le développement des gonades et des cellules germinales chez les deux sexes ainsi que dans la différenciation sexuelle des organes reproducteurs mâles (62). Des récepteurs pour la testostérone sont présents dans les cellules de Sertoli, dans les cellules de Leydig et dans les cellules myoïdes péritubulaires (62, 63). Ainsi, ces types cellulaires sont la cible directe de l'une de ces hormones ayant une action sur le maintien de la fertilité (62).

Bien que la dihydroxytestostérone soit essentielle pour le développement du système reproducteur mâle, la testostérone est l'androgène du testicule qui contrôle directement le développement et les fonctions reproducteurs (62, 63). L'estradiol (E2) et son récepteur (ER α) ont également un rôle à jouer dans le maintien de la fertilité chez le mâle. Les niveaux de testostérone sériques sont beaucoup plus bas que les niveaux intratesticulaires (53).

La deuxième hormone hypophysaire en importance est l'hormone folliculo-stimulante (FSH). La FSH, tout comme la LH, est une glycoprotéine membre de la famille de TGF- β (62). Les cellules de Sertoli ainsi que les spermatogonies possèdent un récepteur pour la FSH. Ainsi, la FSH stimule directement les tubules séminifères via son action sur ces cellules (53). La fonction première de la FSH dans la spermatogenèse est la stimulation de la prolifération des cellules de Sertoli durant le développement pré-pubertaire. Les cellules de Sertoli ont un rôle crucial dans le maintien des cellules germinales ainsi, le nombre des cellules de Sertoli influence directement le nombre de cellules germinales (62).

La FSH serait très importante pour initier la spermatogenèse durant le développement post-natal (64). Durant la puberté, la FSH et la testostérone semblent avoir un effet synergique sur la spermatogenèse (53).

D'autres facteurs sont aussi reconnus pour influencer la spermatogenèse. De récentes études ont mis en évidence l'importance de facteurs locaux ou paracrins sur la spermatogenèse. Ainsi, des cytokines testiculaires et d'autres facteurs de croissance (Il-1, Il-6, TNF, IFN γ , LIF, SCF) sont produits non seulement par les cellules du système immunitaire localisées dans les compartiments interstitiel et tubulaire mais aussi par les cellules de Leydig, les cellules péricubulaires, les spermatogonies immatures et matures ainsi que les spermatozoïdes (58). Ces cytokines et facteurs de croissances auraient un effet sur la prolifération des cellules germinales ainsi que sur les fonctions et les sécrétions des cellules de Leydig et de Sertoli (58).

1.2.6.2 Rétrocontrôle hormonal du système reproducteur mâle

La testostérone produite par les cellules de Leydig inhibe la sécrétion de GnRH de l'hypothalamus ainsi que la sécrétion de LH par l'hypophyse (65). Les cellules de Sertoli produisent une hormone nommée inhibine. Cette hormone faisant partie de la famille de protéines de TGF- β a pour fonction d'inhiber la sécrétion de FSH en agissant comme rétrocontrôle négatif sur la glande pituitaire (65).

1.3 Infertilité mâle

1.3.1 Causes pré-testiculaires affectant les testicules ou les canaux excréteurs

1.3.1.1 Désordres hypothalamique et hypophysaire

Toute maladie entraînant une déficience fœtale des gonadotropines hypophysaires va entraîner une hypoplasie des testicules (51).

1.3.2 Causes testiculaires affectant les testicules

1.3.2.1 Problèmes héréditaires - congénitaux

L'hypoplasie testiculaire est un diagnostic morphologique qui couvre un grand nombre de changements histologiques incluant la perte des cellules germinales et l'arrêt de la spermatogenèse (66). La cryptorchidie est une cause fréquente d'hypoplasie du testicule chez la majorité des mammifères et est caractérisée par une rétention abdominale d'un seul ou des deux testicules (67). Les régions les plus communes où se retrouvent les testicules cryptorchides sont le canal inguinal et la région sous-lombaire de la cavité abdominale postérieure (67). Une variété de changements anatomiques peuvent causer une rétention de l'un ou des deux testicules : malformations scrotales, anneau inguinal trop petit, vaisseaux spermatiques, canal déférent et muscle crémaster trop courts et adhérences péritonéales (67).

Dans le testicule affecté, les tubules séminifères sont petits et possèdent souvent une membrane basale épaissie (68). Dans la plupart des cas, il y a un arrêt de la spermatogenèse (69). Une cryptorchidie unilatérale est souvent associée à de l'infertilité car des changements dégénératifs se produisent également dans le testicule opposé (68, 69). Cette dégénérescence serait possiblement de nature auto-immune et serait engendrée par le testicule retenu (51, 67).

L'hypoplasie testiculaire est associée à plusieurs autres conditions notamment les chromosomes collants (lorsque les chromosomes ne se séparent par complètement lors de la mitose (70)) chez les bovins et le syndrome de Klinefelter (XXY) chez plusieurs espèces dont l'humain (66). La cause de l'hypoplasie testiculaire

est souvent inconnue chez plusieurs espèces (chevaux, chèvres, moutons, porcs) mais souvent soupçonnée d'être héréditaire (66).

Le pseudohermaphrodisme ou féminisation testiculaire est associée à de petits testicules (hypoplasiques), bilatéraux ainsi qu'à une absence des canaux excréteurs (épididyme, canal déférent) causée par une déficience en androgène (67). Le testicule non descendu repose habituellement dans la région inguinale ou dans la cavité péritonéale. Dans les tubules séminifères, il y a habituellement une ou deux rangées de cellules consistant principalement en spermatogonies et en cellules de Sertoli et un très petit nombre de spermatocytes (67).

1.3.2.2 Dégénérescence -Atrophie testiculaire

1.3.2.2.1 La définition

Le terme dégénérescence de l'épithélium germinale est utilisé pour définir un processus dégénératif actif (67). Une condition dégénérative est souvent accompagnée de cellules dégénérées dans la lumière. L'atrophie est un terme approprié lorsqu'il y a perte complète ou partielle de l'épithélium séminifère (67). Les deux termes sont souvent utilisés de façon interchangeable dans la littérature.

1.3.2.2.2 Les causes de la dégénérescence testiculaire

La dégénérescence de l'épithélium germinale se produit spontanément et sans étiologie évidente chez les souris âgées (67). La dégénérescence de l'épithélium germinale est une réponse non-spécifique du testicule face à plusieurs influences négatives telle que la déprivation des gonadotropines hypophysaires, la présence d'androgène ou d'œstrogène exogènes, la présence de radiations ionisantes, la malnutrition, la déficience en vitamines A et E, une pyrexie prolongée, l'amyloïdose

testiculaire, certaines maladies infectieuses, la perte d'innervation, l'occlusion des vaisseaux spermatiques, certaines maladies génétiques ainsi que la présence de certains néoplasmes et agents cytotoxiques (67). Les prochains points détaillent quelques-unes de ces causes.

1.3.2.2.1 Les agents toxiques

La mort d'une population spécifique de cellules germinales peut être observée dans le cas d'agents cytotoxiques affectant, par exemple, seulement les divisions mitotiques des spermatogonies (71, 72). Certaines toxines comme les glycols éthers vont cibler précisément les spermatides en méiose (73).

Les cellules de Sertoli ont un rôle crucial dans le support de la spermatogenèse. À cause de ce rôle important, toute toxine compromettant leur fonction aura des effets néfastes sur les cellules germinales et entraînera des changements dégénératifs à cet endroit (74).

Tout agent interférant avec la voie de la stéroïdogénèse ou avec les niveaux sériques d'hormones régulatrices (LH ou prolactine) est susceptible d'interférer avec la fonction des cellules de Leydig (75, 76). Les cellules de Leydig peuvent aussi être la cible directe de certains agents cytotoxiques (77, 78).

1.3.2.2.2 L'inflammation

Les inflammations du testicule, ou orchites, sont peu fréquentes chez la souris (67). Lorsque présentes, ces infections sont habituellement le résultat d'agents bactériens infectant le testicule et l'épididyme par la voie ascendante ou secondairement à des traumatismes perforants résultant de morsures (67). Les bactéries les plus fréquemment isolées chez la souris sont *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* ainsi que plusieurs espèces

de *Streptococcus* et de *Staphylococcus*. *Pasteurella pneumotropica* ainsi que *Staphylococcus aureus* sont également fréquemment isolés de ce type d'infection chez la souris et causent habituellement une réaction purulente intense (67).

Une inflammation particulière nommée granulome spermatique peut se produire secondairement à un spermatocèle (dilatation kystique d'un tubule du rete testis ou de la tête de l'épididyme contenant habituellement des spermatozoïdes), à des infections bactériennes ou encore à tout trauma rupturant la membrane basale de l'épithélium séminifère (67). Dans ces conditions, la barrière hémato-testiculaire est rompue et le stroma testiculaire se retrouve exposé aux spermatozoïdes. Le résultat est une inflammation granulomateuse (granulome spermatique) caractérisée par de nombreux macrophages épithélioïdes, lymphocytes et cellules géantes multinucléées entourés, dans les cas chroniques, par une capsule fibreuse (67). Dépendamment de la taille des granulomes spermatiques, le mouvement des spermatozoïdes dans le testicule ou l'épididyme peut être affecté. Les granulomes spermatiques sont beaucoup plus communs dans l'épididyme (67).

1.3.2.2.3 L'amyloïdose systémique

Une maladie commune chez plusieurs lignées de souris est l'amyloïdose systémique (79). Les dépôts d'amyloïde affectent les capillaires, les veines de petit calibre et les artères de petit et de moyen calibres. La déposition de ce matériel fibrillaire amorphe peut interférer, dans les cas plus marqués, avec l'apport sanguin dans différents organes y compris l'apport sanguin aux tubules séminifères (79). Également, la déposition d'amyloïde dans le tissu interstitiel conduit à l'atrophie des cellules de Leydig (80).

1.3.2.2.2.4 Désordres vasculaires

L'inflammation de la paroi des vaisseaux sanguins dans le testicule est plus souvent observée dans le cadre d'une vasculite systémique (57). Ces lésions vasculaires systémiques sont reconnues sous les termes suivants : artérite, périartérite, panartérite, polyartérite et nécrose fibrinoïde de la paroi artérielle. Ces lésions sont rapportées occasionnellement chez les souris de la lignée C57Bl/6 (57).

La balance des fluides interstitiels dans le testicule produits en partie par le transudat provenant des capillaires et des fluides des tubules séminifères produits par les cellules de Sertoli, peut être facilement dérangée résultant en une variété d'effets incluant la dilatation ou contraction des tubules séminifères et l'œdème interstitiel (81)

1.3.3 Causes post-testiculaires

1.3.3.1 Troubles congénitaux/héréditaires affectant les canaux efférents et l'épididyme

1.3.3.1.1 Canaux efférents en cul-de-sac

Des anomalies de développement qui résultent en la formation de canaux efférents connectés à une seule extrémité et ainsi nommés canaux efférents en cul-de-sac sont décrits chez plusieurs espèces (59). Deux catégories de canaux en cul-de-sac ont été définies : 1) les canaux en cul-de-sac originant du rete testis ainsi que du segment testiculaire des canaux efférents, 2) les canaux en cul-de-sac originant du segment épididymal des canaux efférents (59). Les deux types d'anomalies ont été rapportés chez le mouton, la chèvre, le porc, le bovin et l'équin, le chien et le rat. Chez le bovin et l'équin, la fréquence des canaux en cul-de-sac est suffisamment grande pour être considérée un facteur important de spermiostase (82, 83). Chez le chien, les canaux

en cul-de-sac sont souvent associés à des granulomes spermatiques ainsi qu'à présence de plusieurs cellules inflammatoires intratubulaires (59, 84). Chez le rat, contrairement aux animaux domestiques, les canaux efférents en cul-de-sac ne contiennent pas de sperme et ne possèdent aucune évidence de granulome spermatique (85). Chez ces derniers, des cils motiles balayant en direction rétrograde sont observés dans plusieurs canaux en cul-de-sac (85). Ce phénomène explique l'absence de sperme dans la lumière de ces canaux (85).

Donc, chez certaines espèces les canaux en cul-de-sac contiennent du sperme stagnant. Chez d'autres espèces, ces tubules ne contiennent habituellement pas de sperme et possèdent un diamètre similaire aux canaux efférents normaux. Leur épithélium est aussi rapporté comme étant anormal morphologiquement (59). Chez le rat, l'épithélium des canaux efférents en cul-de-sac ne posséderait pas toutes les structures lysosomiales typiques et posséderait des mitochondries avec une conformation anormale indiquant une activité métabolique moindre (59). Cette anomalie est directement reliée à un trouble du développement embryonnaire des conduits mésonéphrotiques qui donnent origine aux canaux efférents (59).

1.3.3.1.2 Problème dans la transition entre les canaux efférents et l'épididyme

Puisque les canaux excréteurs de l'appareil reproducteur mâle possèdent une origine embryonnaire différente, la jonction entre le conduit mésonéphrotique (canal de Wolff) et les tubules mésonéphrotiques (canaux efférents) est un endroit à risque (60). Dans des circonstances normales, la transition entre l'épithélium simple cubique cilié du canal efférent et l'épithélium pseudostratifié cylindrique de l'épididyme se fait de façon très abrupte (59).

Chez le porc, cette transition d'un épithélium à l'autre a été identifiée à trois localisations : la jonction bout-à-bout et deux types de jonctions bout-à-côté (Figure 13) (60). La jonction bout-à-bout est caractérisée par l'absence d'embranchement et une transition abrupte entre l'épithélium cilié du canal efférent à l'épithélium simple cylindrique haut de la tête de l'épididyme (Figure 13, A) (60). La majorité des jonctions observées chez le porc entre le canal efférent terminal et l'épididyme est cependant de type bout-à-côté (Figure 13, B et C) (60). Dans ce cas, la transition entre le canal efférent et l'épididyme se fait dans un angle aigu (Figure 13, B et C). La transition entre les deux types d'épithélium se fait soit dans l'épididyme (B) ou dans le canal efférent (C). Dans ce dernier cas, l'extension de l'épithélium de l'épididyme dans le canal efférent entraîne inévitablement un rétrécissement de la lumière et une spermiostase au site de la transition (60).

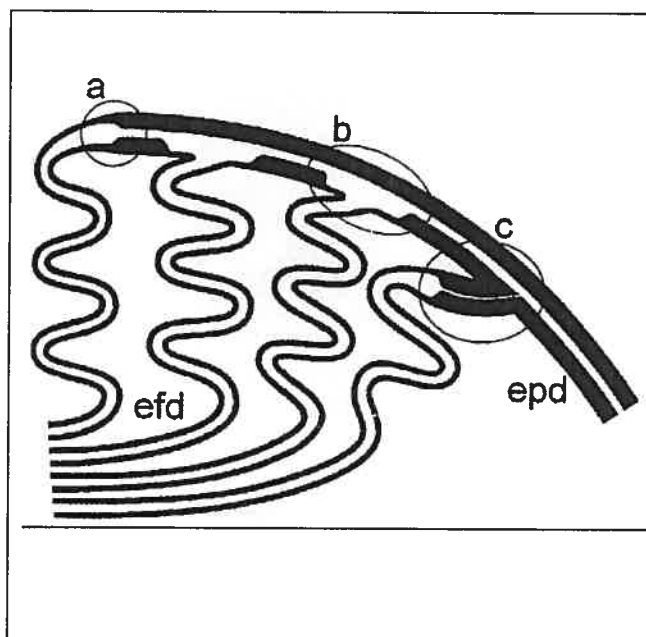


Figure 13.

Jonction entre le canal efférent et épididyme chez le porc

Trois différents types de jonctions entre le canal efférent (efd) et l'épididyme (epd) chez le porc.

A : bout-à-bout

B : bout-à-côté avec la transition entre les épithélia dans l'épididyme

C : bout-à-côté avec la transition entre les épithélia dans le canal efférent

Tiré de "The junctions between efferent ductules and epididymal duct in the boar" (60)

1.3.3.1.3 L'aplasie des canaux excréteurs

L'aplasie des canaux efférents a été rapportée chez l'humain et chez le rat (59, 86) ainsi que chez le bovin (82).

L'aplasie de l'épididyme a été rapportée chez le bovin, la chèvre, le mouton, le chien ainsi que chez l'humain. L'aplasie est unilatérale ou bilatérale. Elle affecte le corps et la queue de l'épididyme plus fréquemment (66). Les structures sont absentes ou sous-développées (hypoplasie). Chez l'humain, cette aplasie de l'épididyme est souvent associée à la fibrose kystique (66).

L'aplasie du canal déférent a été rapportée chez le porc, le chien ainsi que chez l'humain (66). Cette aplasie est unilatérale ou bilatérale (66). Chez le porc, il est rapporté que cette condition entraîne une dilatation de la queue de l'épididyme ainsi que du canal déférent en cul-de-sac par du sperme (66).

1.3.3.2 Désordres acquis affectant les canaux efférents et les épididymes

1.3.3.2.1 L'inflammation

L'inflammation des canaux excréteurs est commune. L'une des présentations est le granulome spermatique. Les granulomes spermatiques développent lorsqu'il y a passage du sperme de la lumière du canal efférent ou de l'épididyme dans le tissu conjonctif adjacent (66). Ce bris de la barrière sanguine survient lors de stase du sperme dans les canaux efférents en cul-de-sac, dans les canaux épididymaux aberrants et lors de spermiostase entraînée par l'adénomyose de l'épididyme (66). Dans cette condition, la population de cellules inflammatoires est principalement composée de lymphocytes et

de macrophages. L'inflammation peut être intratubulaire ou extratubulaire seulement et peut entraîner une obstruction du transit du sperme (56).

1.3.3.2.2 Les toxines affectant les canaux excréteurs

Un petit nombre de toxines ont été reconnues comme ayant une action obstructive sur les canaux efférents (56, 59). L'effet du carbendazime sur les canaux efférents de rat résulte en un détachement prématuré des cellules germinales de l'épithélium séminifère et en une occlusion des canaux efférents par des granulomes spermatiques (87, 88).

Un changement épидидymal observé chez le rat, le chien et l'humain est décrit sous le terme changements cribriformes (89). Ce changement est caractérisé par la présence de proliférations épithéliales dans la lumière tubulaire (89). Ces changements cribriformes sont décrits comme changements cytotoxiques secondaires chez le chien et le rat ainsi que spontané chez certains chiens (89). Les changements cribriformes sont associés à une atrophie testiculaire secondaire et peuvent être secondaires à un déséquilibre hormonal (89, 90).

1.3.4 Conséquences de l'obstruction des canaux efférents et des épидидymes

L'obstruction des canaux efférents conduit à une dégénérescence ainsi qu'à l'atrophie testiculaire secondaire à l'augmentation de la pression des fluides dans les tubules séminifères (91-94).

Deux sites d'obstruction ont été fréquemment étudiés: l'obstruction des canaux efférents et l'obstruction du canal déférent (93). La ligature des canaux efférents chez le rat entraîne une dégénérescence rapide et extensive de l'épithélium séminifère avec une perte sévère des cellules germinales (93). Les dommages à l'épithélium séminifère suite

à l'obstruction de l'épididyme sont possiblement secondaires à l'augmentation de la pression dans les tubules séminifères, à l'accumulation de métabolites et également, à l'absence de substance sécrétée par l'épididyme (93, 95). Les lésions obstructives localisées dans le corps et la queue de l'épididyme sont moins sujettes à entraîner une dégénérescence testiculaire que celles localisées dans les canaux efférents et la tête de l'épididyme (93). Dans le cas des lésions obstructives localisées distalement dans les canaux excréteurs, la stase des fluides et des spermatozoïdes peut être compensée par la réabsorption et la phagocytose faites par les canaux efférents et la tête de l'épididyme diminuant de ce fait la pression de reflux dans le testicule (95).

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Dans l'étude de cette lignée de souris transgénique démontrant de l'infertilité mâle, le projet est séparé en deux volets distincts : la caractérisation du génotype de la lignée de souris et la caractérisation du phénotype d'infertilité observé chez les souris mâles homozygotes. Voici les hypothèses proposées dans ce projet de recherche.

Pour le volet portant sur la caractérisation du génotype, l'hypothèse est la suivante :

1. Les transgènes se sont insérés dans le génome de la souris, à un ou plusieurs sites d'intégration et entraînent un dérèglement d'un seul ou de plusieurs gènes d'importance dans la fonction reproductrice mâle.

Pour la caractérisation du phénotype observé chez les souris mâles homozygotes, l'hypothèse est la suivante :

2. Il y a des changements morphologiques et/ou fonctionnels dans le système reproducteur venant expliquer l'infertilité des souris homozygotes mâles.

Les objectifs généraux de ce projet sont donc :

1. Déterminer le nombre et l'emplacement exact du site d'intégration des transgènes dans le génome.
2. Déterminer le (s) gènes affectés par l'insertion des transgènes.
3. Étudier la fonction du/des gène(s) potentiellement affecté(s) et son/ leur implication dans le système reproducteur mâle.
4. Caractériser les changements morphologiques observables expliquant l'infertilité mâle de cette lignée de souris.

MÉTHODOLOGIE

3.1 Les souris transgéniques anti-5

3.1.1 La lignée

La lignée de souris FVB utilisée provenait du laboratoire du Dr David Silversides à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Les souris FVB/N sont des souris cosanguines albinos (96). Ces souris sont utilisées pour la technique de micro-injection pronucléaire car leurs œufs fécondés ont un pronoyau mâle proéminent (96).

Cette lignée de souris est homozygote pour l'allèle de la dégénérescence rétinienne ($Pde6b^{rd1}$) et sont donc aveugles à la puberté. La lignée FVB comporte aussi une mutation dans le gène de la tyrosinase (locus *c*) qui résulte en une substitution d'un acide aminé sérine pour celui de la cystéine (96, 97). La protéine tyrosinase est donc non-fonctionnelle chez cette lignée et résulte en une absence de coloration du pelage (albinos) (97).

3.1.2 Caractéristiques des transgènes

Deux transgènes ont été conçus en laboratoire. Le premier transgène ou transgène principal est composé du promoteur de la Protamine- Yellow Fluorescence Protein antisense et du SV40 polyA. Le promoteur de la protamine est exprimé de façon spécifique dans les spermatides. Le but de l'utilisation de ce promoteur est donc d'activer le gène du Yellow Fluorescence Protein antisens dans cette population cellulaire spécifique (98). Le second transgène inséré est composé du minigène de la tyrosinase aussi nommé Tyrosinase Enhancer Transgene. Ce deuxième transgène contribue à donner une coloration au pelage des souris ayant intégré les transgènes (97).

3.1.3 La création des souris transgéniques par micro-injection pronucléaire

Les souris transgéniques ont été créées dans le laboratoire du Dr David Silversides par la procédure de micro-injection pronucléaire telle que décrite dans plusieurs publications (2, 99, 100).

3.1.4 Les souris transgéniques anti-5

Cette lignée de souris transgéniques a été créée afin d'étudier le développement embryonnaire du système reproducteur. Cependant, des problèmes d'infertilité identifiés chez les mâles homozygotes pour les transgènes limitaient leur utilisation pour les fins auxquelles ils avaient été créés.

Les souris étudiées dans ce projet de recherche étaient donc des souris mâles homozygotes et hétérozygotes pour les transgènes, âgés entre 2 et 4 mois.

Contrairement aux souris FVB/N, les souris transgéniques de la lignée anti-5 avaient un pelage pigmenté (Figure 14). Ces souris avaient donc bel et bien intégré les transgènes dans leur génome. Le transgène du minigène de la Tyrosinase confère la pigmentation du pelage aux souris l'ayant intégré (97). Les souris hétérozygotes étaient plus pâles tandis que les souris homozygotes ayant deux copies du site d'intégration du transgène (homozygote), étaient plus foncées (97).

Les mâles homozygotes de la lignée de souris transgéniques anti-5 étaient infertiles. Les mâles hétérozygotes, pour leur part, démontraient une fertilité normale.



Des études préliminaires portant sur l'examen macroscopique et microscopique des tissus provenant d'une souris mâle homozygote et d'une souris mâle hétérozygote ont démontré des changements marqués dans l'appareil reproducteur mâle. Ces changements étaient présents seulement chez le mâle homozygote. Les tissus de la souris mâle hétérozygote ne présentaient aucun changement significatif et ont donc été utilisés ici en guise de contrôle.

3.2 Caractérisation génique

3.2.1 Identification du site d'intégration du transgène

Deux techniques ont été utilisées pour identifier le site ainsi que le nombre de sites d'insertion des transgènes dans le génome : l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et l'adaptation d'une technique basée sur l'amplification par polymérase en chaîne (PCR) utilisant le « Universal Genome Walker Protocol » (BD BioSciences Clontech, San Jose, Ca, USA). L'annexe 6 présente la description détaillée de la technique.

3.2.1.1 Hybridation *in situ* en Fluorescence (FISH)

Les lames non-chargées sont déposées dans un contenant pour lames et on ajoute de l'acide chlorhydrique. On laisse reposer la solution contenant les lames pour une période de 24 heures. Les lames sont ensuite lavées à l'eau courante déionisée pour 10-20 minutes.

Le milieu de culture est préparé avec 4 ml de sérum fœtal de bovin contenant 20ml de RPMI media 1640 et 200 µl de L-glutamine à 37°C et finalement 50 mg/ml de lipopolysaccharide (LPS).

Une sonde spécifique à la tyrosinase nommée TyBs et marquée avec la digoxigénine est utilisée dans cette procédure d'hybridation *in situ*. La sonde a été créée dans le laboratoire du Dr Paul Overbeek au Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Des segments de la rate d'une souris homozygote sont coupés en petits morceaux et placés dans 10 ml de milieu de culture cellulaire. Le tout est placé dans un incubateur à 37°C (5% CO₂) pour 48 heures.

Les cellules sont récoltées selon des méthodes conventionnelles de cytogénétique. Les chromosomes en métaphase sont ensuite étalés sur les lames qui sont séchées à l'air et conservées à -20°C.

Les lames séchées à l'air sont colorées avec le Giemsa afin d'observer les bandes G sur les chromosomes en métaphase.

Les métaphases contenant le bon nombre de chromosomes et démontrant des bandes G bien distinctes sont localisées, photographiées et ensuite décolorées dans l'éthanol 70% avant l'hybridation *in situ*.

Les lames sont immergées dans du formol 3% à pH neutre pour 3 minutes. Ces dernières sont par la suite immergées dans du SSC pour 30 minutes à 37°C et déshydratées dans une série de bains d'éthanol 70%, 80% et 95%.

La solution d'hybridation contient 5 µg d'ADN complémentaire de souris et 200 ng de la sonde, nommée TysB, dans 50% formamide/ 2X SSC avec du sulfate dextran 10%. La solution est appliquée aux lames et une lamelle 22x 20 mm est déposée et scellée avec du « rubber cement ».

Les lames et la sonde sont dénaturées à 75°C pour 2.5 à 3 minutes et placées dans une chambre humide à 37°C pour hybridation durant la nuit.

Le signal d'hybridation est détecté avec l'ajout de sérum anti-digoxigénine marqué avec la fluorescéine (FITC) et les chromosomes sont colorés avec 0,5 µg/ml de 4'-6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) dans une solution tampon.

Les bandes G des chromosomes en métaphase sont ensuite comparées aux chromosomes sous la lumière fluorescente pour identifier la localisation et le nombre de sites d'insertion des transgènes.

3.2.1.2 Le protocole “ Universal GenomeWalker ”

Une souris femelle homozygote de 7 mois a été euthanasiée et les reins et la rate ont été prélevés pour isolement de l'ADN. L'ADN a été isolé avec la trousse pour les tissus animaux (QIAGEN, Ontario, Canada).

La première étape de la digestion enzymatique est caractérisée par le choix d'enzymes de restriction coupant l'ADN de façon mousse. Le choix des trois enzymes est PMLI, NRUI, BmgBI. Ces trois enzymes sont actives à 37 °C et inactives à 65°C et

20°C. Les digestions enzymatiques sont exécutées selon le protocole décrit dans « Universal GenomeWalker kit » (BD Biosciences Clontech, San Jose, Ca, USA)

Suivant l'incubation à 37 °C durant la nuit, 100 µl d'ADN est purifié avec l'ensemble de purification «QIAquik PCR Purification kit » (QIAGEN, Ontario, Canada).

La liaison de l'ADN génomique à l'adapteur GenomeWalker a été exécutée telle que décrite dans le manuel de l'utilisateur « Universal GenomeWalker Kit » (BD Biosciences Clontech, San Jose, Ca, USA).

La prochaine étape vise à établir les quatre différents scénarios possibles des oligonucléotides en fonction de la position sens ou antisens des différents éléments du transgène en vue de l'amplification par PCR d'un segment d'ADN génomique au site d'intégration (Annexe 1).

Ayant établi les différentes possibilités, les réactions d'amplification par PCR ont été montées. Les tableaux en annexes 2 et 3 présentent les réactions de PCR emboîtées avec les oligonucléotides créés. Six oligonucléotides par enzymes de restriction ont été utilisés pour un total de 18 réactions de PCR. Des réactions emboîtées de PCR ont été montées afin d'augmenter la spécificité de la réaction. Ces réactions de PCR sont présentées dans les tableaux A et B avec la séquence des oligonucléotides utilisés. Ces réactions d'amplification par PCR sont montées selon le protocole « Advantage 2 PCR Enzyme System » (BD Biosciences Clontech, San Jose, Ca, USA). Les temps utilisés pour les cycles d'amplification étaient de : 1 cycle 95°C - 1 min, 35 cycles à 95°C pour 30 secondes, suivi de 65°C pour 6 min et finalement, 1 cycle à 65° C pour 6 minutes.

Les amplicons de PCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% contenant 10 µg de bromure d'éthidium. Une échelle d'ADN standard a été utilisée (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) en même temps que les amplicons afin d'obtenir les standards de migration des poids moléculaires.

Les segments d'ADN amplifiés ont ensuite été placés dans un vecteur afin d'être transformés. La liaison des échantillons a été faite selon le protocole « PGEMT and PGEMT easy vector system » (Promega, Madison, WI, USA). La liaison a été incubée pour 2 heures à la température de la pièce.

Le plasmide a ensuite été inséré dans des bactéries compétentes. Deux cent cinquante microlitres de bactéries compétentes décongelées à la température ambiante ont été ajoutées. Les échantillons ont été placés dans un bain-marie à 42 °C pour 90 secondes et ensuite, le mélange a été placé dans 600 µl de milieu de culture bactérien. Les échantillons ont ensuite été placés à 37°C pour 45 minutes dans un incubateur.

Les pétris ont été identifiés. Par la suite, 40 µl de Xgal a été ajouté à chacun des pétris (20mg/ml) et ensuite 4 µl/pétri de deisopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). En terminant, 250 µl de chacun des milieux de culture ont ensuite été ajoutés aux pétris, suivis d'un bon étalement. Les pétris ont finalement été placés dans un incubateur à 37°C pour une période de 12 heures.

Le lendemain, les colonies positives, c'est-à-dire celles qui étaient blanches, ont été identifiées. Les pétris ont été placés à 4°C jusqu'à la mise en milieu de culture.

Les colonies blanches ont été définies comme ayant intégré le plasmide au site du gène de la bêta galactosidase rendant ainsi ce gène non-fonctionnel. Les colonies n'ayant pas intégré le plasmide avaient donc le gène de la bêta-galactosidase toujours

fonctionnel et étaient donc de couleur bleue. Les colonies blanches ont donc été sélectionnées et piquées dans les milieux de cultures identifiés. Les milieux de culture ont ensuite été placés dans un incubateur à 37°C pour la nuit.

Les minipreps ont été faits selon le protocole utilisant le « QIAprep Spin Miniprep Kit » (QIAGEN, Ontario, Canada).

Le principal mélange a été monté pour 20 digestions (20X) et était composé de l'enzyme PSI (0,5 µl x 20 = 10 µl), du tampon 10X (2 µl x 20 = 40 µl), de l'enzyme SPH I (0,5 µl x 20 = 10 µl) et de l'eau (12 µl x 20 = 240 µl). Les digestions ont été montées en ajoutant l'ADN plasmidique à chacune. Les digestions ont été placées dans un bain-marie à 37°C pour 1 heure.

Les plasmides ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% contenant 10 µg de bromure d'éthidium. Une échelle d'ADN standard (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) a été migrée en même temps que les amplicons afin d'obtenir les standards de migration. Les bandes représentatives ont été identifiées. Les échantillons représentatifs ont finalement été envoyés pour séquençage.

Les résultats du séquençage ont été comparés avec des bases de données publiques (*Ensembl mouse genome data*).

3.3 Caractérisation morphologique

3.3.1 Les nécropsies

Un premier groupe comportant six souris âgées entre 2 et 4 mois (trois homozygotes et trois hétérozygotes) a été nécropsié. Les souris ont été pesées et nécropsiées selon un protocole de nécropsie préalablement établi. Tous les tissus provenant des systèmes: digestif (foie, esophage, estomac, intestin), respiratoire (voies

respiratoires supérieures, trachée, poumons), endocrinien (thyroïdes, parathyroïdes, glandes surrénales), nerveux (cerveau, cervelet, hypophyse, moëlle allongée), musculo-squelettique (os et muscles squelettiques des membres inférieures et de la tête), cardiovasculaire (cœur et aorte) et hématopoïétique (rate, moëlle osseuse) ainsi que les reins ont été placés dans du formol 10% tamponné. Les organes reproducteurs mâles incluant les testicules, les épидидymes, canaux efférents ainsi que les glandes sexuelles accessoires (vésicules séminales, glandes coagulantes, prostate) et le système urinaire inférieur (vessie, urètre) ont été placés dans le fixateur Davidson modifié pour 24 heures pour ensuite être coupés et placés dans l'alcool 70% (101). Suite à une fixation dans le formol 10% tamponné pour 24 heures, les crânes des souris, les membres inférieurs et les sternums ont été décalcifiés dans du TBD-2 (Thermos electron) pour une période de 24 heures et ont été coupés et placés dans du formol 10% tamponné.

N'ayant observé aucun changement macroscopique et histopathologique à l'extérieur du système reproducteur mâle dans la première cohorte, une deuxième cohorte comportant dix souris (sept homozygotes et trois hétérozygotes) âgées entre 2 et 4 mois a été nécropsiée. Les organes internes ont été analysés macroscopiquement et seuls les systèmes reproducteurs mâles incluant les testicules, les épидидymes, les canaux efférents de même que les glandes accessoires (prostates, vésicules séminales, glandes coagulantes) ainsi que l'appareil urinaire inférieur (vessie, urètre) ont été prélevés. Les organes ont été placés dans le fixateur Davidson modifié pour une période de 24 heures pour ensuite être placés dans l'alcool 70% (101). Cinq sections transversales et longitudinales ont été faites sur chaque paire de testicules. Les sections longitudinales permettent une bonne visualisation du rete testis tandis que les sections transversales

permettent d'identifier les stades du cycle spermatogénique pour chacun des tubules séminifères. Les épидидymes avec les canaux efférents ont été placés intacts dans les cassettes ainsi que les vésicules séminales et les glandes coagulantes. Afin de visualiser la prostate, l'urètre pelvienne a été sectionnée longitudinalement.

Au total, dix-huit souris mâles âgées entre 9 et 18 semaines ont été nécropsiées. Sur ce nombre, onze souris étaient homozygotes pour le transgène et présentaient le phénotype d'infertilité tandis que sept souris étaient hétérozygotes, et ne démontraient pas de problème d'infertilité. Les deux groupes de souris étaient âgés entre 2 et 4 mois et provenaient de mêmes portées. Ils étaient donc élevés ensemble sous les mêmes conditions environnementales.

Les testicules et les épидидymes de chacune des souris ont été pesés après fixation sur une balance micrométrique et les poids ont été compilés dans un tableau en Annexe 5.

Les tissus de tous les organes ont été montés dans des blocs de parafine, coupés au microtome à 4 μm d'épaisseur et colorés au H&E.

Des sections additionnelles des testicules et des épидидymes ont été coupé au microtome et colorées au PAS.

3.3.2 Traitement statistique des données objectives

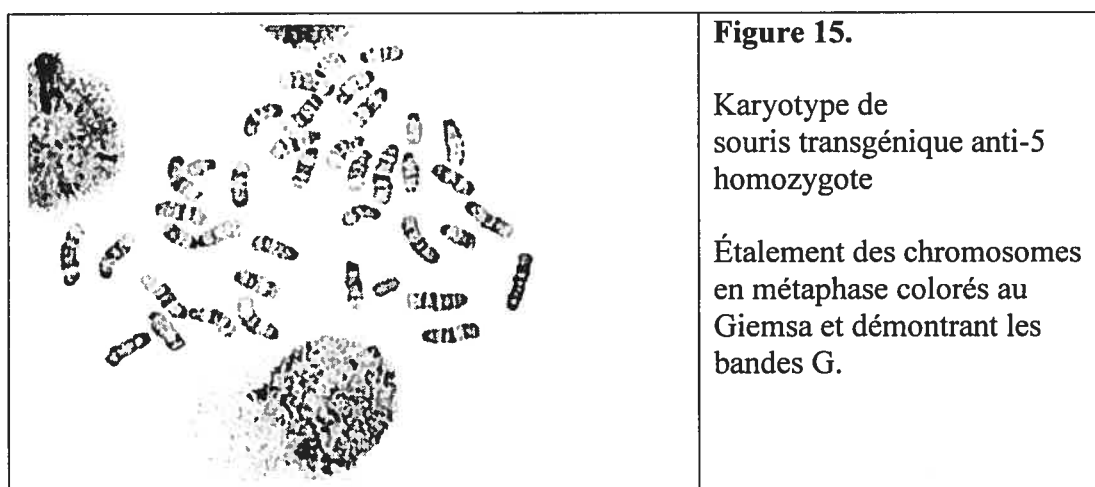
Les poids des testicules et épидидymes provenant des souris homozygotes et hétérozygotes ont été comparés en utilisant le « Student t-test » pour données non-pairées, avec le seuil fixé à 0,05. Tous les tests statistiques ont été effectués en utilisant le logiciel Prism 4 for MacIntosh, version 4.0a (GraphPad Software, Inc.).

PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

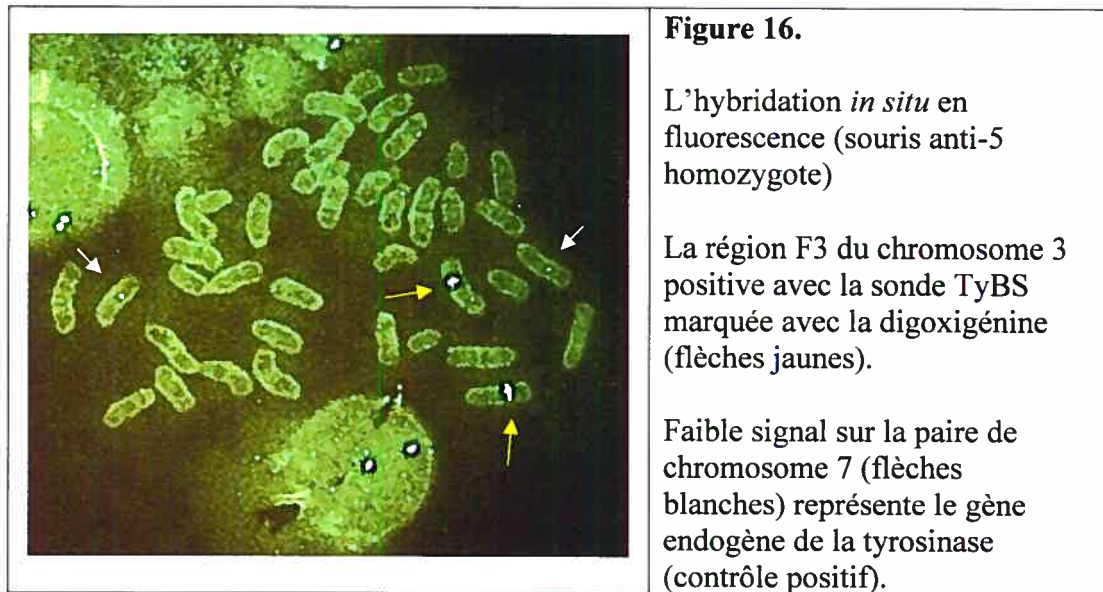
4.1 Résultats de la caractérisation génétique

4.1.1 Identification du site d'insertion du transgène par l'hybridation *in situ* en fluorescence

La Figure 15 présente un étalement des chromosomes en métaphase et coloré au Geimsa. Les bandes G permettent une bonne identification des 20 paires de chromosomes constituant le génome de la souris.



À l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), un fort signal de fluorescence a été identifié sur deux chromosomes (Figure 16). Un signal plus faible a également été perçu sur deux autres chromosomes. Des noyaux en interphase présentaient également des signaux de fluorescences. Les chromosomes ont été identifiés un à un en comparant les bandes G avec un idiogramme de souris provenant d'une banque de données publiques (Figure 3). La région de forte fluorescence (flèches jaunes) est localisée sur le chromosome 3 et plus précisément dans la région F3 de ce chromosome. La sonde utilisée (TyBs) était spécifique pour le gène de la tyrosinase dans le transgène nommé minigène de la tyrosinase.



Le fort signal obtenu indiquait un grand nombre de copies et représentait le site d'insertion vraisemblable des transgènes. Le faible signal qui a été identifié sur la paire de chromosome 7 (flèches blanches) représentait probablement le gène endogène de la tyrosinase localisé à cet endroit (contrôle positif) (43). Les mêmes trouvailles ont été confirmées sur plusieurs métaphases, observées sur plusieurs préparations de lames lors de cette expérimentation.

Un seul site d'insertion des transgènes a donc grossièrement été identifié dans la région F3 du chromosome 3.

4.1.2 Identification du site d'insertion du transgène par PCR

L'utilisation du « Universal GenomeWalker Kit » avait pour but de cerner plus précisément le site d'insertion des transgènes dans le génome (43).

Des exemples des différentes bandes isolées des réactions d'amplification par PCR sont présentés en annexe 4. Faisant suite à la liaison, à la transformation et à la

digestion, les échantillons d'ADN ont été envoyés pour séquençage. Les résultats du séquençage ont ensuite été comparés avec des banques de données publiques.

À quelques reprises, des segments d'ADN génomique sur le chromosome 7 ont été séquencés (gène endogène de la tyrosinase) (43). Un segment d'ADN génomique provenait de l'extrémité SP6 du vecteur a également été séquencé et localisé sur le chromosome 11. Ce segment ne comportait pas l'extrémité de l'adaptateur API. Un autre segment prometteur localisait le transgène sur le chromosome 17. Aucun segment n'a été séquencé autour de la région F3 du chromosome 3.

4.2 Résultats de la caractérisation morphologique

4.2.1 Données objectives

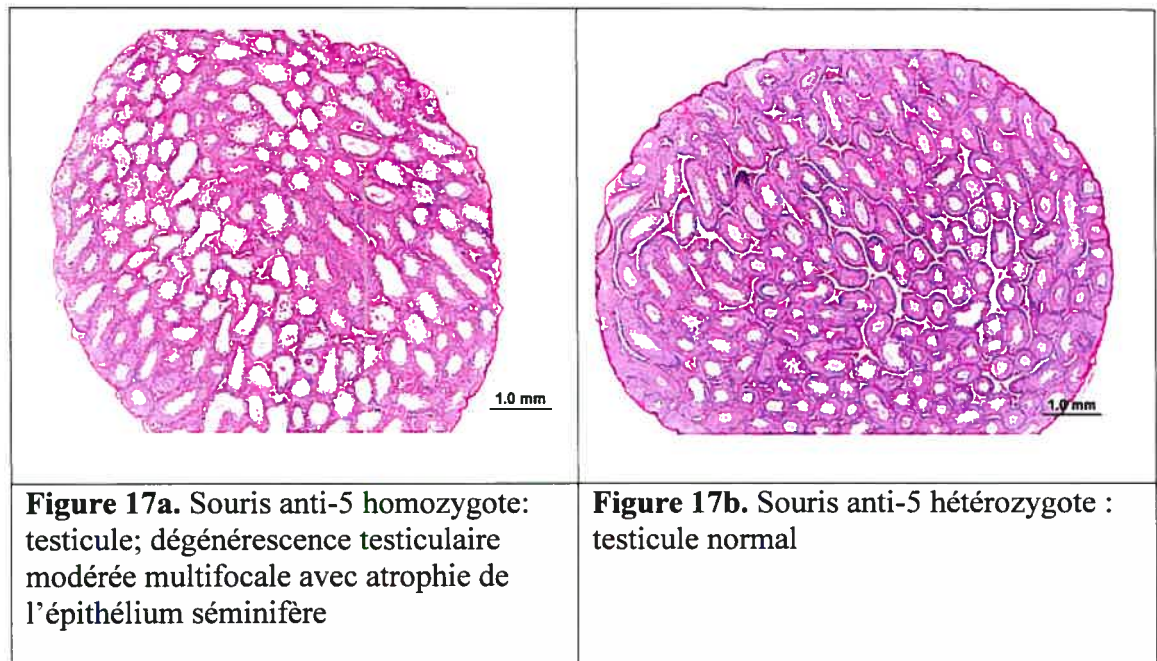
Les poids des testicules et épидидymes provenant des souris homozygotes et hétérozygotes ont été mesurés et comparés (Annexes 5a et 5b). Les testicules des souris homozygotes étaient significativement ($P = 0,001$) plus petits [$151,1 \pm 6,13\text{mg}$ (MOY \pm SEM, $n = 10$)] que ceux du groupe contrôle [$197,5 \pm 10,41\text{mg}$ (MOY \pm SEM, $n = 6$)]. Contrairement aux testicules, la comparaison des poids des épидидymes ne révéla aucune différence significative ($P = 0,28$) [homozygotes : $83,72 \pm 7,86\text{mg}$ (MOY \pm SEM, $n = 10$), hétérozygotes : $71,39 \pm 4,85$ (MOY \pm SEM, $n = 6$)].

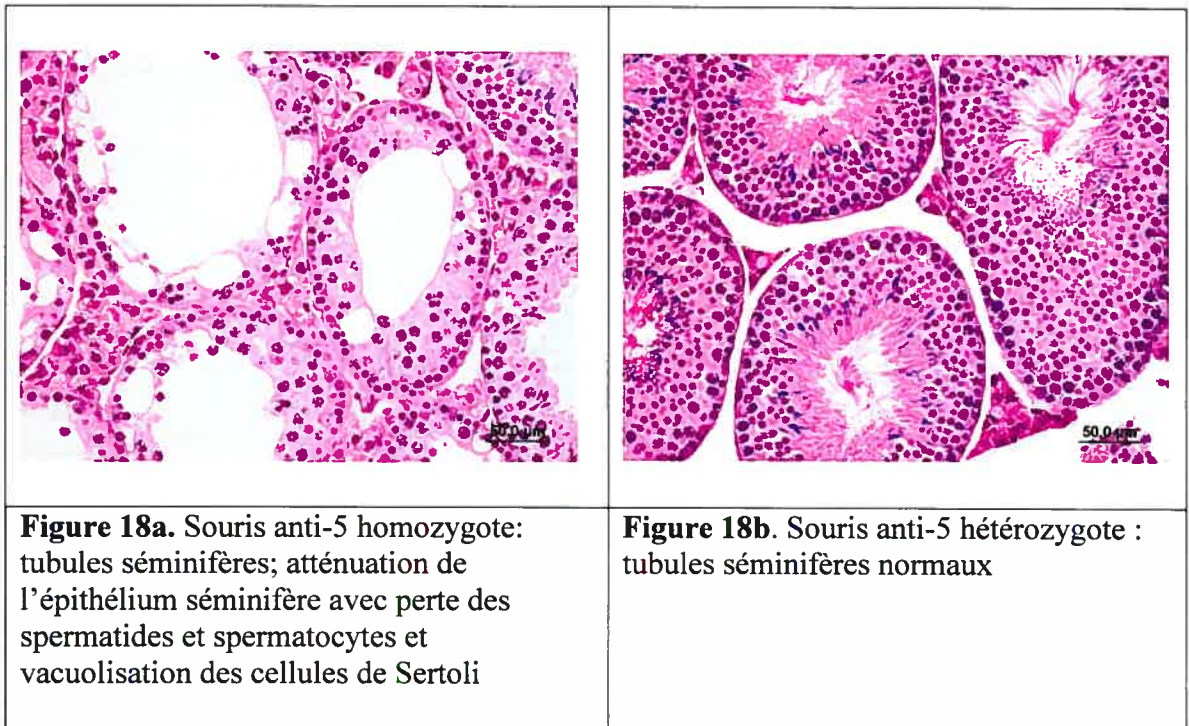
4.2.2 Changements morphologiques

Les testicules des souris homozygotes apparaissaient macroscopiquement plus petits que ceux des hétérozygotes et ils étaient descendus dans le scrotum. L'examen histologique des sections révélait une atrophie segmentaire, multifocale, modérée à sévère de l'épithélium germinal (Figure 17a) comparé au contrôle (Figure 17b). Ces

changements étaient présents dans des degrés variables chez la totalité (10/10) des sujets homozygotes.

L'épithélium germinal était multifocalement désorganisé et dépourvu de spermatocytes et de spermatides. Multifocalement, le cytoplasme des cellules de Sertoli présentait de larges vacuoles claires (Figure 18a) comparé au contrôle (Figure 18b). Multifocalement, il y avait des cellules épithéliales multinucléées (symplastes) au sein de l'épithélium germinal ainsi que dans la lumière tubulaire (101). Ces cellules multinucléées contenaient occasionnellement des fragments de spermatozoïdes dans leur cytoplasme (phagocytose). Une spermiostase (stase du sperme) était occasionnellement observée dans la lumière tubulaire. De nombreuses cellules germinales viables au stade de spermatide étaient exfoliées dans la lumière tubulaire multifocalement.





La spermiostase était plus marquée dans le rete testis et était accompagnée par une dilatation de celui-ci (Figure 19a) avec la présence de cellules multinucléées, de cellules germinales exfoliées et de spermatozoïdes phagocytés. Les changements dans la figure 19a ont été comparés au contrôle (Figure 19b).

Tous les stades du cycle spermatogénique étaient présents chez tous les sujets. En raison du patron mosaïque de dégénérescence tubulaire, il était également possible d'observer que la maturation des spermatogonies était complète et qu'il y avait relâche de spermatides allongés durant le processus de spermiation. Les changements dégénératifs de l'épithélium séminifères étaient légers à modérés chez les sujets de 2 mois et n'évoluaient pas en sévérité jusqu'à 4 mois d'âge.

Les canaux efférents présentaient une ectasie (dilatation) multifocale minimale à modérée, avec la présence d'une spermiostase chez certains sujets. La présence de nombreuses cellules épithéliales exfoliées comportant des fragments cytoplasmiques de

spermatozoïdes (PAS +) était observée dans la lumière tubulaire chez tous les sujets homozygotes (Figure 20a) comparé au sujet contrôle (Figure 20b).

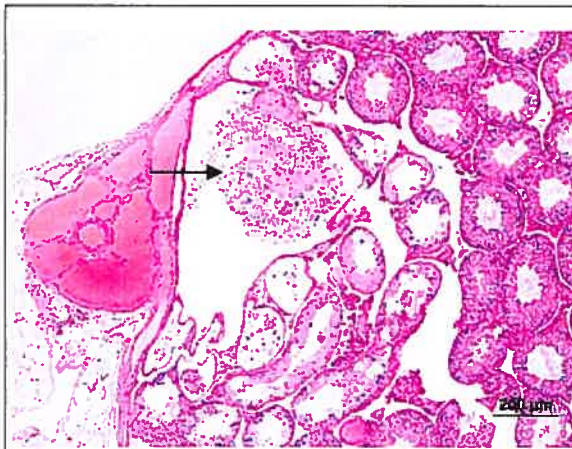


Figure 19a. Souris anti-5 homozygote : rete testis ; spermiostase modérée avec présence de cellules germinales (spermatides ronds et allongés) et débris cellulaires (flèche) 100X

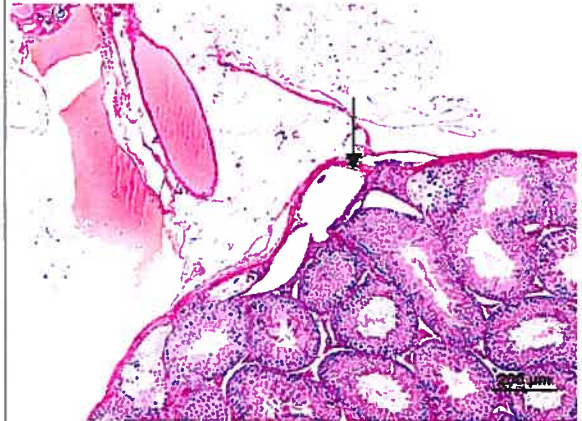


Figure 19b. Souris anti-5 hétérozygote : rete testis normal (flèche) 100X

L'épithélium bordant les canaux efférents était d'apparence normale et était bordé de cils. Chez certains sujets il y avait un infiltrat inflammatoire interstitiel minimal composé de macrophages et de neutrophiles.

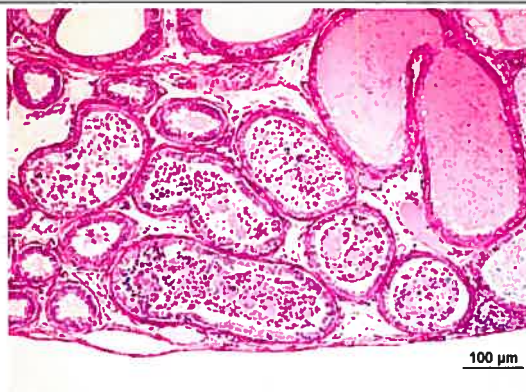
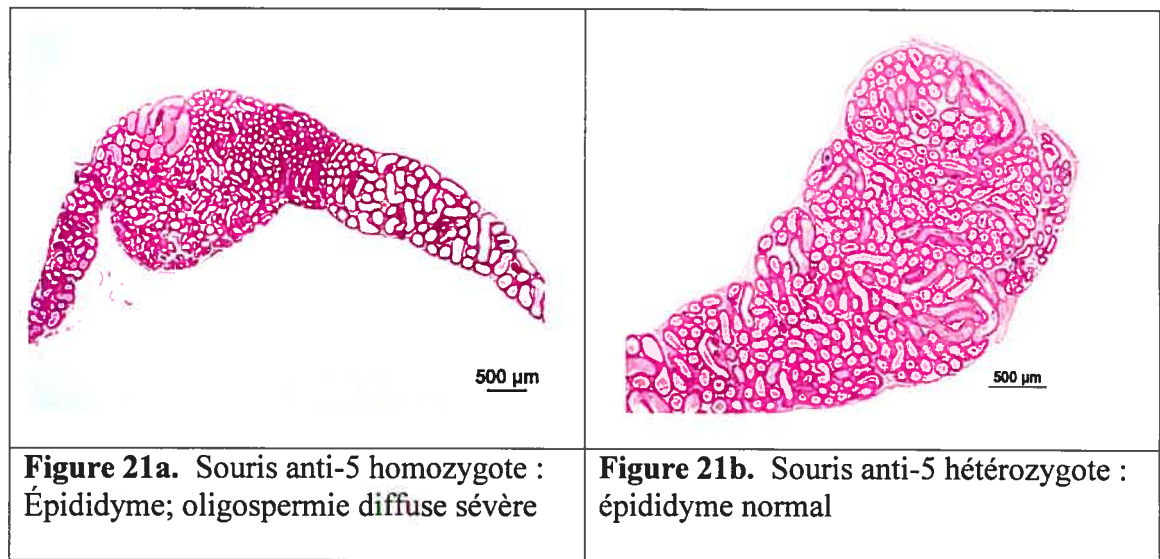


Figure 20a. Souris anti-5 homozygote : canaux efférents ; spermiostase modérée avec cellules germinales



Figure 20b. Souris anti-5 hétérozygote : canaux efférents normaux (flèche)



Dans l'épididyme, il y avait une oligospermie sévère diffuse (Figure 21a) comparé au contrôle (Figure 21b). Dans une minorité de sujets, des rares spermatozoïdes étaient observés dans les tubules près de la jonction avec les canaux efférents.

Les tubules étaient légèrement à modérément distendus et comportaient occasionnellement des cellules épithéliales dans la lumière, accompagnées par la présence d'un matériel PAS positif (sécrétions tubulaires) (101).

Multifocalement dans la tête de l'épididyme, les tubules étaient petits, tortueux et certains étaient dépourvus d'une lumière. L'épithélium tubulaire était d'épaisseur inégale multifocalement. De façon multifocale dans la tête de l'épididyme, il y avait de multiples replis de l'épithélium tubulaire et de la membrane basale formant occasionnellement une striction et vraisemblablement un rétrécissement (sténose) de la lumière tubulaire (Figure 22a) comparé au contrôle (Figure 22b). Ces replis étaient localisés exclusivement dans la tête de l'épididyme. La portion luminale des replis était dépourvue de cellules épithéliales. Nous avons donné le terme dysplasie tubulaire de la

tête de l'épididyme à ces changements. Cette dysplasie tubulaire était limitée à la tête de l'épididyme. Dans le corps et la queue de l'épididyme, les tubules étaient légèrement distendus et étaient dépourvus de spermatozoïdes. Cette portion de l'épididyme contenait une plus grande quantité de matériel PAS positif (sécrétions tubulaires) chez les souris homozygotes que chez les souris contrôles. La présence de cellules inflammatoires comme des macrophages et des neutrophiles était observée dans l'interstitium. Des macrophages étaient aussi observés dans l'interstitium chez l'une des souris hétérozygotes.

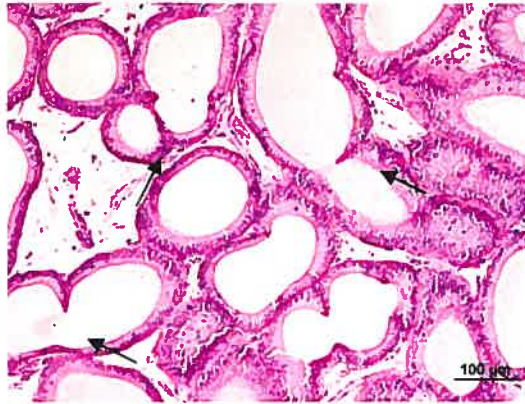


Figure 22a. Souris anti-5 homozygote : épididyme (tête); dysplasie tubulaire modérée multifocale avec sténose tubulaire (flèches)

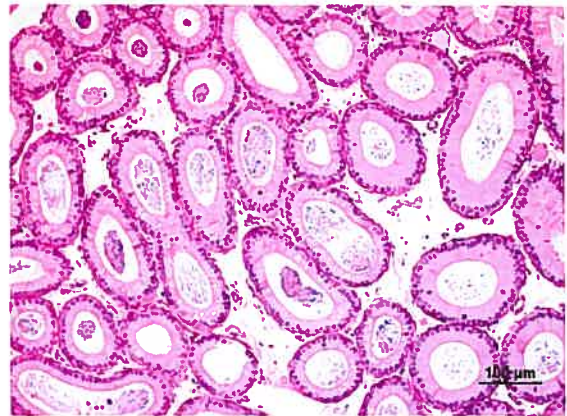


Figure 22b. Souris anti-5 hétérozygote : épididyme (tête) normal

L'examen des glandes sexuelles accessoires mâles (prostata, vésicules séminales, glandes coagulantes ainsi que les glandes prépucciales) n'a pas révélé de changements histopathologiques.

DISCUSSION

5.1 Caractérisation génique

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) nous a donné un signal très fort constant et répété dans la région F3 du chromosome 3. Le fort signal de fluorescence reflète un nombre élevé de copies du minigène de la tyrosinase et par association, un nombre possiblement élevé du transgène principal. Comme prévu, nous avons également eu un signal faible sur le chromosome 7 représentant les deux copies du gène endogène de la tyrosinase localisé sur ce chromosome (contrôle interne) (43).

Aucun autre signal fluorescent significatif n'a été identifié sur un autre chromosome venant certifier l'absence d'un deuxième site d'intégration des transgènes dans le génome.

L'utilisation du « Universal GénomeWalker kit » ne nous a pas fourni de résultat concluant et concordant avec les résultats obtenus avec le FISH. Plusieurs possibilités peuvent expliquer ceci. Une première possibilité est basée sur le fait que le bon fonctionnement de la technique est dépendant des enzymes de restriction utilisées et de l'endroit où ces enzymes sectionnent l'ADN. Nous avons choisi et utilisé seulement trois enzymes de restriction différentes. Il est possible, voire probable que ces enzymes aient pu couper l'ADN très loin du site d'insertion du transgène (plus de 10 000 pb). L'amplification par PCR d'un aussi gros segment d'ADN devient difficile. Ce problème peut également favoriser l'amplification de segments non spécifiques.

Un deuxième problème est l'interférence entre les oligonucléotides pour le transgène du minigène de la tyrosinase avec la séquence endogène du gène de la tyrosinase (43). À plusieurs reprises, nous avons amplifié des segments d'ADN

génomique localisés dans la proximité du gène endogène de la tyrosinase sur le chromosome 7.

5.2 Caractérisation morphologique

Chez toutes les souris mâles homozygotes de la lignée anti-5, tous les stades du cycle spermatogénique étaient présents. En effet, en raison du patron de dégénérescence en mosaïque de l'épithélium séminifère, il a été possible d'observer que dans plusieurs tubules, la spermatogenèse évoluait normalement et était complète i.e. que le processus de maturation des spermatogonies évoluait jusqu'à la spermiation. Ces observations indiquent que l'atténuation multifocale de l'épithélium séminifère n'est pas secondaire à un arrêt dans la maturation au cours de la spermatogenèse mais probablement secondaire à une agression quelconque sur l'épithélium séminifère. Dans ce cas-ci, il est également probable que la perte des cellules germinales ne soit pas secondaire à leur mort mais bien à leur exfoliation dans la lumière tubulaire. L'exfoliation des cellules germinales est habituellement secondaire à la perte d'adhésion entre les cellules de Sertoli et les spermatides ou à la rupture du cytoplasme des cellules de Sertoli (93, 101). La présence de cellules multinucléées dans l'épithélium germinal ou dans la lumière tubulaire résulte généralement de la fusion des spermatides suite à une altération des ponts intercellulaires les liants aux cellules de Sertoli. De telles cellules ont été observées dans une étude portant sur la ligature des canaux efférents chez la souris (102) et lors d'épididymydectomie chez le rat (103).

De nombreuses vacuoles claires étaient présentes multifocalement dans le cytoplasme des cellules de Sertoli ou entre celles-ci. La vacuolisation des cellules de Sertoli ou la présence de vacuoles entre les cellules de Sertoli peut représenter une

altération du réticulum endoplasmique ou encore une altération de l'homéostasie des fluides. La vacuolisation des cellules de Sertoli peut également être secondaire à la perte d'un grand nombre de cellules germinales (101).

Une dilatation du rete testis a été observée chez les sujets homozygotes accompagnée par une spermiostase variable. L'épithélium bordant le rete testis a pour fonction de réabsorber les fluides provenant des tubules séminifères. Lorsqu'une obstruction est présente dans les canaux efférents ou dans l'épididyme, les fluides et les cellules s'accumulent dans le rete testis et entraînent la dilatation de celui-ci (101). Une augmentation prolongée de la pression hydrostatique sur l'épithélium germinal va généralement résulter en une atrophie de ce dernier à des degrés variables (101, 104). Les obstructions localisées dans le corps et la queue de l'épididyme vont généralement entraîner moins de dégénérescence testiculaire car les fluides et les spermatozoïdes seront réabsorbés dans les canaux efférents et dans la tête de l'épididyme (95).

Les canaux efférents présentaient une légère dilatation, une spermiostase modérée multifocale et la présence occasionnelle de cellules germinales dans la lumière tubulaire. Ces trouvailles morphologiques excluent la présence de tubules en cul-de-sac caractérisés par une lumière réduite, par l'absence de spermatozoïdes dans la lumière et par la perte de granules cytoplasmiques positive au PAS (85). La présence de cellules germinales dans les canaux efférents vient appuyer la présence de la jonction patente entre le rete testis et les canaux efférents. Il est difficile dans ce cas-ci d'exclure l'absence ou une mauvaise jonction entre les canaux efférents et l'épididyme. Cette jonction n'est pas facilement observable histologiquement et chez la majorité des souris transgéniques homozygotes, le liquide séminal accompagné par les cellules germinales

ne se retrouvait pas dans l'épididyme. Cependant, dans de rares cas, un très petit nombre de cellules germinales et de spermatides allongés ont été observés dans la tête de l'épididyme.

Chez toutes les souris homozygotes, les épididymes étaient dilatés multifocalement et présentaient une oligospermie sévère. Multifocalement, principalement localisée dans la tête de l'épididyme, une dysplasie tubulaire était présente. Les tubules étaient tortueux, plusieurs ne présentaient pas de lumière tubulaire et multifocalement, il y avait des strictions de la lumière tubulaire. L'épithélium tubulaire était d'épaisseur variable multifocalement. Cette dysplasie tubulaire a été observée de façon consistante chez tous les sujets homozygotes et n'était pas présente chez les sujets contrôles. La spermiostase était localisée proximale à ces nombreuses sténoses tubulaires associées aux changements dysplasiques. L'oligospermie sévère était localisée de façon consistante distale à ces changements.

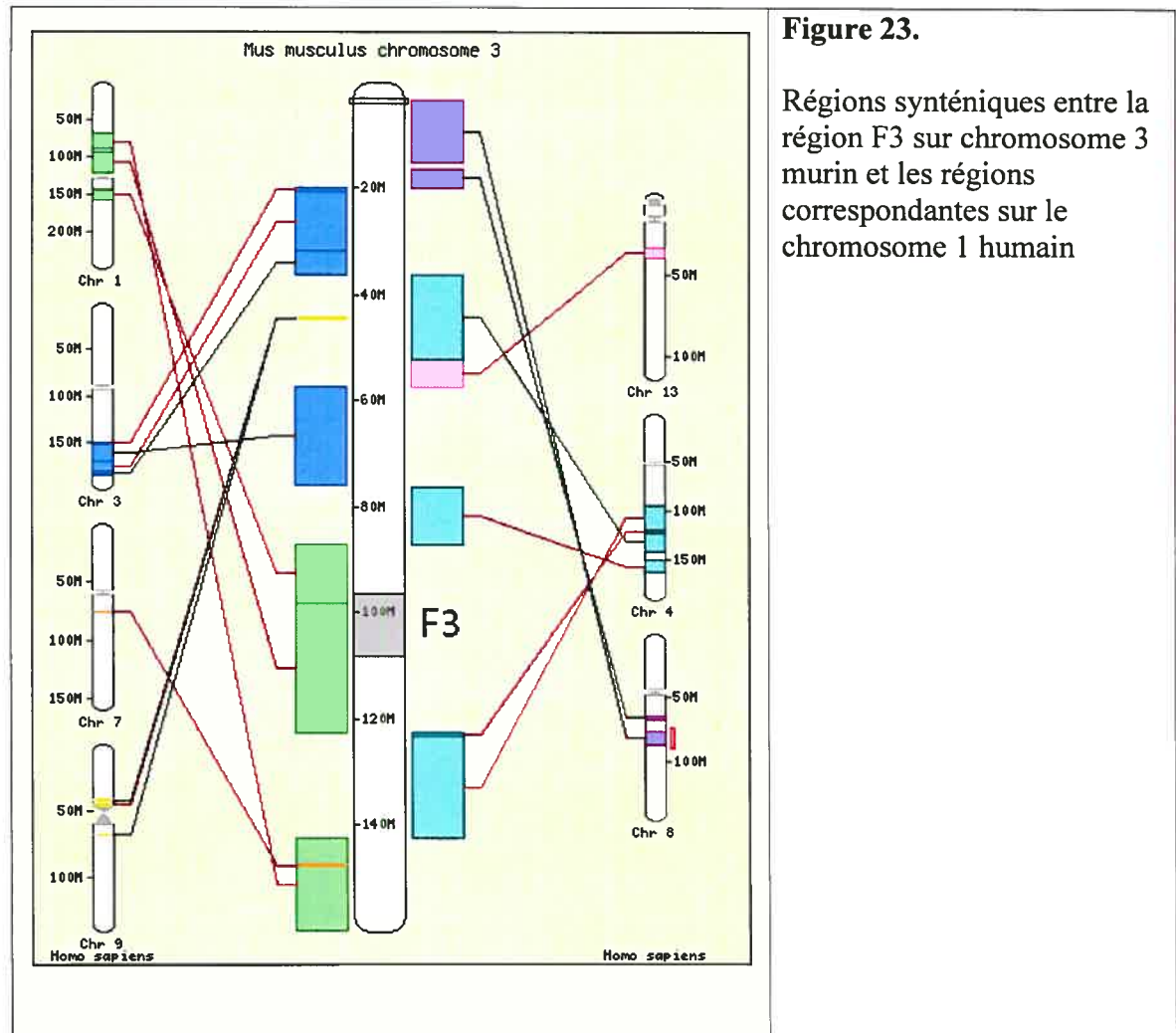
Les changements histopathologiques observés dans la tête de l'épididyme de ces souris-ci n'ont pas été décrits dans la littérature et n'ont pas été observés par les spécialistes du système reproducteur des rongeurs que nous avons consultés (Dr Dianne M. Creasy, pathologiste, Huntingdon Life Sciences, New Jersey; Dr Richard Hess, professeur, Collège de Médecine Vétérinaire, l'Université de l'Illinois; Dr Marvin Meistrich, professeur, Université du Texas, MDAnderson Cancer Center). Nous avons donc conclu que les changements observés dans l'épididyme étaient vraisemblablement secondaires au dérèglement d'un ou de plusieurs gènes endogènes suite à l'insertion des transgènes et non pas un épiphénomène. Il est également fort probable que les

changements tubulaires observés dans la tête de l'épididyme sont responsables de l'azoospermie constatée chez ces sujets et qu'il s'agisse donc d'azoospermie obstructive. L'absence de jonction ou la jonction anormale entre les canaux efférents et l'épididyme n'ont cependant pas pu être exclues.

5.3 Caractérisation génomique

Une question importante qui n'a pas pu être résolue par nos études est l'identité du (des) gène(s) fonctionnellement affecté(s) par l'insertion du transgène. Une approche possible pour cerner des gènes candidats est d'identifier des gènes déjà impliqués dans des problèmes reproducteurs chez la souris et situés aux alentours de la région chromosomale 3F3, en utilisant des bases de données génomiques disponibles au public. Une analyse de la région F3 du chromosome 3 utilisant les bases de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) révèle la présence de 170 gènes. De ceux-ci, un seul a déjà été associé à des problèmes reproducteurs chez le mâle, selon la base de données Mouse Genome Informatics (MGI, www.informatics.jax.org). Ce gène (*Csfl*) code pour la protéine colony stimulating factor-1, une cytokine impliquée dans divers processus physiologiques et développementaux, incluant la survie, la prolifération, la différenciation et le fonctionnement des cellules phagocytaires mononucléaires (105). Il a récemment été rapporté qu'une mutation de ce gène entraîne une baisse des concentrations sériques de testostérone et une réduction de la proportion des spermatozoïdes viables chez la souris mâle (106). De plus, les souris mutantes pour la *Csfl* souffrent d'une variété d'autres anomalies phénotypiques, incluant l'absence d'incisives, un crâne bombé, des os longs épaissis avec des cavités médullaires réduites

et des problèmes d'audition et de vision (106). Étant donné les différences considérables entre ces observations et nos observations phénotypiques chez la souris Anti-5 homozygote, il semble peu probable que le gène *Csf1* soit impliqué dans sa pathogénèse.



Une seconde approche possible pour cerner des gènes candidats est d'identifier des gènes associés à des conditions humaines et situés dans des régions chromosomales synténiques. Selon la base de données du génome de la souris du NCBI

(http://www.ensembl.org/Mus_musculus/index.html), la région F3 du chromosome 3 correspond à deux régions distinctes du chromosome 1 chez l'humain (Figure 23).

Une recherche de la base de données Online Inheritance in Man (OMIM, www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) n'a pu révéler de maladies ou de syndromes humains affectant l'appareil reproducteur mâle et associés à un gène localisé dans ces régions spécifiques du chromosome 1. En regard de cette analyse, il semble probable que l'insertion du transgène chez la souris Anti-5 ait affecté un gène qui n'a pas encore été caractérisé chez la souris et chez l'humain.

CONCLUSION ET DIRECTIONS FUTURES

Le protocole utilisant le « Universal GenomeWalking Kit » devrait être refait avec un plus grand éventail d'enzymes de restriction ce qui améliorerait les chances de succès. Dans ce cas, un plus grand nombre d'enzymes de restriction aurait pour but d'augmenter nos chances de couper l'ADN près du transgène contribuant ainsi à améliorer nos chances d'amplifier par PCR un segment de taille raisonnable.

Une autre technique pourrait également être utilisée afin de déterminer le site d'intégration des transgènes. Cette technique consiste en la création d'une librairie d'ADN à l'aide de bactériophages (107). Une sonde radioactive spécifique au transgène est ensuite appliquée au filtre et une radiographie est prise pour identifier le segment d'ADN comportant le transgène. L'ADN est ensuite isolé et séquencé (107).

En regard des résultats obtenus avec l'examen histopathologique, nous concluons que la lésion principale se situe dans l'épididyme ou encore à la jonction épididyme - canaux efférents et que les changements observés dans les testicules sont secondaires à une obstruction localisée distalement. Ainsi, des analyses utilisant des microarrays pourraient être faites en utilisant les épididymes et canaux efférents des souris homozygotes et en les comparant aux épididymes et canaux efférents des souris hétérozygotes. Cependant, les lésions observées dans la tête de l'épididyme pourraient être reliées au développement embryonnaire des tubules mésonéphrotiques et/ou de la jonction entre les tubules mésonéphrotiques (canaux efférents) et celui du conduit mésonéphrotique (canal de Wolff). Ainsi, la localisation précise de la lésion dans les tubules mésonéphrotiques durant le développement embryonnaire serait essentielle afin d'obtenir des résultats avec les analyses de microarrays.

En regard des trouvailles morphologiques observées dans l'épididyme, la prochaine étape serait d'observer morphologiquement le développement embryonnaire des canaux mésonéphrotiques proximaux pour ainsi mieux décrire la formation et l'évolution des lésions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Daneau, I., and Silversides, D. W. Les souris pour la recherche biomédicale. *Le Médecin Vétérinaire du Québec*, 35: 15-20, 2005.
2. Auerbach, A., B. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol*, 51: 9-31, 2004.
3. Nagy, A., Gertesenstein M., Vintersten K., and Behringer R. Manipulation of the Mouse Embryo, third edition. New York.
4. Lin, T. P. Microinjection of mouse eggs. *Science*, 151: 333-337, 1966.
5. Jaenisch, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 1260-1264, 1976.
6. Anderson, W. F., Killos, L., Sanders-Haigh, L., Kretschmer, P. J., and Diacumakos, E. G. Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 5399-5403, 1980.
7. Capecchi, M. R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22: 479-488, 1980.
8. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 7380-7384, 1980.
9. Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M., Senear, A. W., Warren, R., and Palmiter, R. D. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27: 223-231, 1981.

10. Costantini, F. and Lacy, E. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature*, 294: 92-94, 1981.
11. Wagner, T. E., Hoppe, P. C., Jollick, J. D., Scholl, D. R., Hodinka, R. L., and Gault, J. B. Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 6376-6380, 1981.
12. Wagner, E. F., Stewart, T. A., and Mintz, B. The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 5016-5020, 1981.
13. Gordon, J. W. and Ruddle, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214: 1244-1246, 1981.
14. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156, 1981.
15. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 7634-7638, 1981.
16. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323: 445-448, 1986.
17. Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326: 292-295, 1987.

18. Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., and Evans, M. J. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326: 295-298, 1987.
19. Bradley, A. and Liu, P. Target practice in transgenics. *Nat Genet*, 14: 121-123, 1996.
20. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck,

J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe,

- K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. and Chen, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921, 2001.
21. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P.,

Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C. and Lander, E. S. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520-562, 2002.

22. Perkins, A. S. Functional genomics in the mouse. *Funct Integr Genomics*, 2: 81-91, 2002.

23. Klysik, J. Mice and humans: chromosome engineering and its application to functional genomics. *Acta Biochim Pol*, 49: 553-569, 2002.
24. Gordon, J. W. and Ruddle, F. H. DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow--a review. *Gene*, 33: 121-136, 1985.
25. Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Difilippantonio, M. J., Wilson, P. C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D. R., Redon, C., Ried, T., Bonner, W. M., Honjo, T., Nussenzweig, M. C., and Nussenzweig, A. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature*, 414: 660-665, 2001.
26. Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y. M., Morrison, C., and Takeda, S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8388-8394, 2001.
27. Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., and Palmiter, R. D. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 4438-4442, 1985.
28. Lacy, E., Roberts, S., Evans, E. P., Burtenshaw, M. D., and Costantini, F. D. A foreign beta-globin gene in transgenic mice: integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues. *Cell*, 34: 343-358, 1983.
29. Rulicke, T. and Hubscher, U. Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp Physiol*, 85: 589-601, 2000.
30. Muller, M. M., Gerster, T., and Schaffner, W. Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur J Biochem*, 176: 485-495, 1988.

31. Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J*, *15*: 1255-1264, 1996.
32. Magyar, J. P., Martini, R., Ruelicke, T., Aguzzi, A., Adlkofer, K., Dembic, Z., Zielasek, J., Toyka, K. V., and Suter, U. Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci*, *16*: 5351-5360, 1996.
33. Weissenberger, J., Steinbach, J. P., Malin, G., Spada, S., Rulicke, T., and Aguzzi, A. Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene*, *14*: 2005-2013, 1997.
34. Raeber, A. J., Sailer, A., Hegyi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Fischer, M., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*: 3987-3992, 1999.
35. Simon, D. and Knowles, B. B. Newly acquired peri-telomeric heterochromatin in a transgenic mouse lineage. *Cytogenet Cell Genet*, *62*: 211-213, 1993.
36. Dorer, D. R. and Henikoff, S. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, *77*: 993-1002, 1994.
37. Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., and Macino, G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of

- Neurospora is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J*, 15: 3153-3163, 1996.
38. Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D., and Flavell, R. B. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell*, 88: 845-854, 1997.
 39. Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., and Birchler, J. A. Cosuppression in Drosophila: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell*, 90: 479-490, 1997.
 40. Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet*, 20: 465-499, 1986.
 41. Meisler, M. H. Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet*, 8: 341-344, 1992.
 42. Rijkers, T., Peetz, A., and Ruther, U. Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res*, 3: 203-215, 1994.
 43. Boyer, A., Paquet, M., Raiwet, D., Daneau, I., Harrison, W., and Silversides, D. W. Rapid genomic identification of transgenic integration sites for mouse insertional mutants. *Biotechniques*, 34: 32-34, 36, 2003.
 44. Friedman, R. A. Transgenic insertional mutagenesis. Applications to inner-ear genetics. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 122: 252-257, 1996.
 45. Barthold, S. W. "Muromics": genomics from the perspective of the laboratory mouse. *Comp Med*, 52: 206-223, 2002.

46. Brathmann, J. L., Richkind, K., Lawery, M.C., Flejter W., Fax L., Stane J., Brathmann A., and Martinez L. Molecular Cytogenetic. *In*: C. Clericuzia (ed.), Genetic Drift. Albuquerque, NM, 1996.
47. Swain A., Sex Determination and Differentiation. *In*: T. P. P. L. Rossant Janet (ed.), Mouse Development Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis, First edition. San Diego, California: Academic Press, 2002.
48. Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 450-452, 1990.
49. Lovell-Badge, R. Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 339: 159-164, 1993.
50. Kaufman M. H. The Anatomical Basis of Mouse Development, first edition, p. 291. London, United Kingdom: Harcourt Brace & Company, 1999.
51. Sinowatz F., A. W., Plendl J., Neumüller Ch., Normal Development of the Testes and Male Accessory Sex Organs. *In*: D. D. L. Mohr U., Capen C.C., Carlton W.W., Sunberg J.P., and Ward J.M., (ed.), Pathobiology of the Aging Mouse, Vol. 1, pp. 405-419. Washington D.C.: International Life Sciences institute, 1996.
52. Radovsky Ann, M. K., and Chapin R.E. Male Reproductive Tract. *In*: R. R. Maronpot (ed.), Pathology of the Mouse, pp. 699. Vienna, Illinois: Cache River Press, 1999.
53. Russell L. D. Histological and Histopathological Evaluation of The Testis, first edition., 1990.

54. Millette, C. F., and Bellve, A. R. Temporal expression of membrane antigens during mouse spermatogenesis. *J Cell Biol*, 74: 86-97, 1977.
55. Green, E.L. *Biology of the Laboratory Mouse*, second edition, p. 706. New York: Dover, 1968.
56. Foley, G. L. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol Pathol*, 29: 49-63, 2001.
57. Maronpot, R. R. *Pathology of the Mouse*, first edition, p. 689. Vienna, IL: Cache River Press, 1999.
58. Huleihel, M., and Lunenfeld, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*, 6: 259-268, 2004.
59. Illo K.Y. Structure and Function of the Ductuli Efferentes: A review. *Microscopy Research and Technique*, 29: 432-467, 1994.
60. Stoffel, M. H., and Friess, A. E. The junctions between efferent ductules and epididymal duct in the boar. *Andrologia*, 29: 283-285, 1997.
61. Creasy, D. M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol*, 29: 64-76, 2001.
62. Holdcraft, R. W., and Braun, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl*, 27: 335-342, 2004.
63. Walker, W. H., and Cheng, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130: 15-28, 2005.
64. Madhwa Raj, H. G., and Dym, M. The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. *Biol Reprod*, 14: 489-494, 1976.

65. Seok, O. S., Ahn, J. M., Mayo, K. E., and Cho, B. N. Developmental changes in inhibin-alpha gene expression in the mouse testis. *Mol Cells*, 17: 67-72, 2004.
66. McEntee, K. Reproductive Pathology of Domestic Mammals. San Diego, California: Academic Press limited, 1990.
67. Gordon Lea R., and Boorman G.A., Spontaneous Nonneoplastic and Neoplastic Lesions and Experimentally Induced Neoplasms of the Testes and Accessory Sex Glands. *In*: D. D. L. Mohr U., Capen C.C., Carlton W.W., Sunberg J.P., Ward J.M., (ed.), Pathobiology of the Aging Mouse, Vol. 1. Washington D.C.: International Life Sciences institute, 1996.
68. Salman, F. T., Adkins, E. S., and Fonkalsrud, E. W. Morphologic effects of unilateral cryptorchidism on the contralateral descended testis. *J Pediatr Surg*, 23: 439-443, 1988.
69. Kocak, I., Dundar, M., Hekimgil, M., and Okyay, P. Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian J Androl*, 4: 183-186, 2002.
70. Al Achkar, W., Sabatier, L., and Dutrillaux, B. How are sticky chromosomes formed? *Ann Genet*, 32: 10-15, 1989.
71. Meistrich, M. L. Stage-specific sensitivity of spermatogonia to different chemotherapeutic drugs. *Biomed Pharmacother*, 38: 137-142, 1984.
72. Meistrich, M. L. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod*, 34: 17-28, 1986.
73. Creasy, D. M., Flynn, J. C., Gray, T. J., and Butler, W. H. A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Exp Mol Pathol*, 43: 321-336, 1985.

74. Creasy, D. M., Beech, L. M., Gray, T. J., and Butler, W. H. The ultrastructural effects of di-n-pentyl phthalate on the testis of the mature rat. *Exp Mol Pathol*, 46: 357-371, 1987.
75. Russell, L. D., Malone, J. P., and MacCurdy, D. S. Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. *Tissue Cell*, 13: 349-367, 1981.
76. Dirami, G., and Cooke, B. A. Effect of a dopamine agonist on luteinizing hormone receptors, cyclic AMP production and steroidogenesis in rat Leydig cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 150: 393-401, 1998.
77. Kerr, J. B., Millar, M., Maddocks, S., and Sharpe, R. M. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat Rec*, 235: 547-559, 1993.
78. Bartlett, J. M., Kerr, J. B., and Sharpe, R. M. The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *J Androl*, 7: 240-253, 1986.
79. Thung, P. J. Senile amyloidosis in mice. *Gerontologia*, 1: 259-279, 1957.
80. Lea R. Gordon, J. A. M., and Boorman G. A. Spontaneous Nonneoplastic and Neoplastic Lesions and Experimentally Induced Neoplasms of the Testes and Accessory Sex Glands. *In: Pathobiology of the aging mouse*, Vol. 2, pp. 421-438. 1996.

81. Setchell, B. P. Local control of testicular fluids. *Reprod Fertil Dev*, 2: 291-309, 1990.
82. Blom, E. Aplasia of the ductuli efferentes--a new sterilizing congenital syndrome in the bull. *Nord Vet Med*, 34: 431-434, 1982.
83. Hemeida, N. A., Sack, W. O., and McEntee, K. Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *Am J Vet Res*, 39: 1892-1900, 1978.
84. Foley, G. L., Bassily, N., and Hess, R. A. Intratubular spermatic granulomas of the canine efferent ductules. *Toxicol Pathol*, 23: 731-734, 1995.
85. Guttroff, R. F., Cooke, P. S., and Hess, R. A. Blind-ending tubules and branching patterns of the rat ductuli efferentes. *Anat Rec*, 232: 423-431, 1992.
86. Ajisawa, C., Ikadai, H., and Imamichi, T. [Morphological study on the hypoplastic testis with aplasia of the epididymis, ductus deferens, and gland of the ductus deferens in the TW inbred rat]. *Jikken Dobutsu*, 34: 189-195, 1985.
87. Nakai, M., Moore, B. J., and Hess, R. A. Epithelial reorganization and irregular growth following carbendazim-induced injury of the efferent ductules of the rat testis. *Anat Rec*, 235: 51-60, 1993.
88. Hess, R. A., Moore, B. J., Forrer, J., Linder, R. E., and Abuel-Atta, A. A. The fungicide benomyl (methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate) causes testicular dysfunction by inducing the sloughing of germ cells and occlusion of efferent ductules. *Fundam Appl Toxicol*, 17: 733-745, 1991.
89. Abbott, D. P. Cribriform intra-tubular epididymal change and testicular atrophy. *Histopathology*, 23: 293, 1993.

90. Butterworth, D. M., and Bisset, D. L. Cribriform intra-tubular epididymal change and adenomatous hyperplasia of the rete testis--a consequence of testicular atrophy? *Histopathology*, 21: 435-438, 1992.
91. Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., and Lubahn, D. B. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390: 509-512, 1997.
92. Ikadai, H., Fujita, H., Ajisawa, C., and Imamichi, T. Sperm retention cysts in the efferent duct and testicular atrophy of TE inbred rats. *J Reprod Fertil*, 81: 635-641, 1987.
93. Flickinger, C. J., Baran, M. L., Howards, S. S., and Herr, J. C. Degeneration of the seminiferous epithelium following epididymal obstruction in prepubertal rats. *Anat Rec*, 254: 76-86, 1999.
94. Hess, R. A. Effects of environmental toxicants on the efferent ducts, epididymis and fertility. *J Reprod Fertil Suppl*, 53: 247-259, 1998.
95. Kennedy P.C., and Palmer N.C. *Pathology of Domestic Mammals*, 4th edition. San Diego, California: Academic Press limited, 1993.
96. Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., and Hansen, C. T. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 2065-2069, 1991.
97. Methot, D., Reudelhuber, T. L., and Silversides, D. W. Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, 23: 4551-4556, 1995.

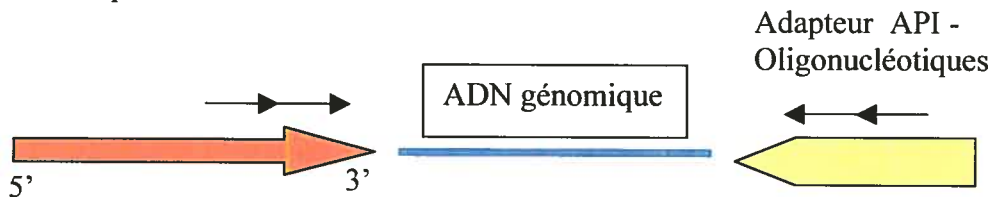
98. Zambrowicz, B. P., Harendza, C. J., Zimmermann, J. W., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 5071-5075, 1993.
99. Wall, R. J. Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells*, 3: 209-220, 2001.
100. Co, D. O., Borowski, A. H., Leung, J. D., van Der Kaa, J., Hengst, S., Platenburg, G. J., Pieper, F. R., Perez, C. F., Jirik, F. R., and Drayer, J. I. Generation of transgenic mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection. *Chromosome Res*, 8: 183-191, 2000.
101. Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., and Goodman, D. G. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol Pathol*, 30: 507-520, 2002.
102. Singh, S. K., and Abe, K. Light and electron microscopic observations of giant cells in the mouse testis after efferent duct ligation. *Arch Histol Jpn*, 50: 579-585, 1987.
103. Soler, C., Nunez, J., Pertusa, J. F., Nunez, M., and Nunez, A. Testicular changes in adult rat following bilateral partial (caput) epididymectomy. *Rev Esp Fisiol*, 46: 147-153, 1990.
104. Altay, B., Hekimgil, M., and Cikili, N. Histopathological examination of both ipsilateral and contralateral testes with different obstructive models in prepubertal and adult rats. *BJU Int*, 88: 84-89, 2001.
105. Chitu, V., and Stanley, E. R. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 18: 39-48, 2006.

106. Cohen, P. E., Chisholm, O., Arceci, R. J., Stanley, E. R., and Pollard, J. W.
Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol Reprod*, 55: 310-317, 1996.
107. Lodish H., B. A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J.,
Molecular Cell biology, 4th edition, p. 1184. New York: W.H. Freeman and Company, 2000.

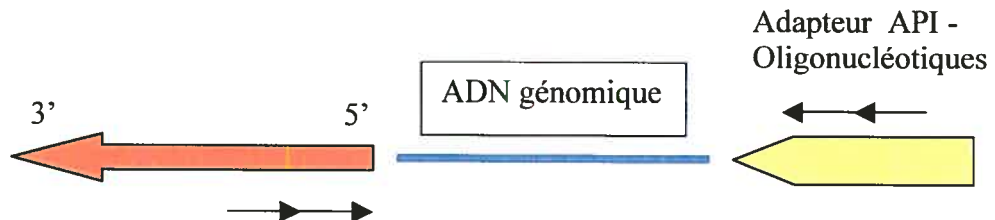
ANNEXE 1

Schéma des six scénarios possibles des oligonucléotides pour les transgènes avec l'adaptateur API GenomeWalker

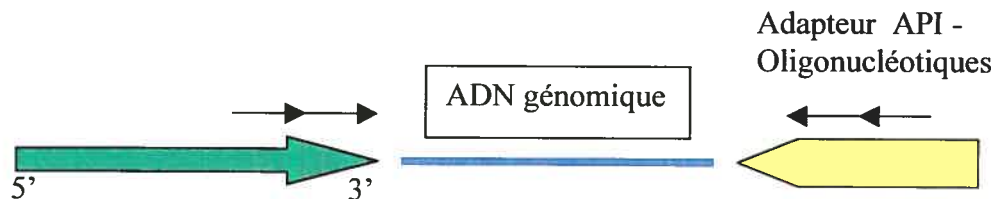
1) Transgène : Promoteur protamine- YFP antisens-SV40 poly A – Oligonucléotiques senses



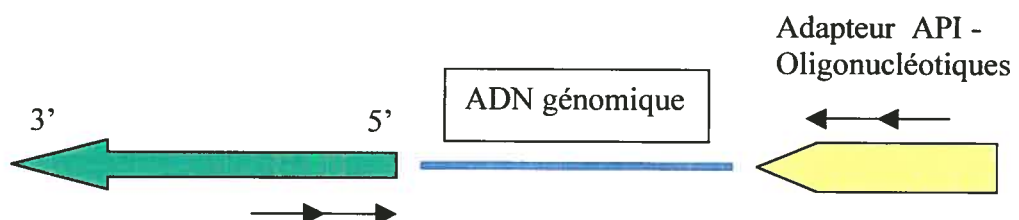
2) Transgène : Promoteur protamine- YFP antisens-SV40 poly A – Oligonucléotiques antisenses



3) Transgène : Tyrosinase minigène – Oligonucléotiques senses



4) Transgène : Tyrosinase minigène – Oligonucléotiques anti-senses



ANNEXE 2

| Premières réactions de PCR | | | |
|----------------------------|-------------|------------------|-------------------------------|
| Réaction | Échantillon | Oligonucleotide | Séquences |
| 1C | Bmgb1 | TyrosWalk1 | GGTCAGGAAGCAACATGAGCAATTCAG |
| 2C | Bmgb1 | TyrosWalkA | AGCCACTCCTCATGGACAAAGACGACTA |
| 3C | Bmgb1 | Sv40 WalkA | GATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG |
| 4C | Bmgb1 | Protamine Walk 1 | CAAAGCCAGAGGGTCTCAGAGTTGCAG |
| 5C | Bmgb1 | CMVP antiWalkI | TGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT |
| 6C | Bmgb1 | Sv40 Walk A | GATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG |
| 7C | NRU1 | TyrosWalk1 | GGTCAGGAAGCAACATGAGCAATTCAG |
| 8C | NRU1 | TyrosWalkA | AGCCACTCCTCATGGACAAAGACGACTA |
| 9C | NRU1 | Sv40 WalkA | GATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG |
| 10C | NRU1 | Protamine Walk 1 | CAAAGCCAGAGGGTCTCAGAGTTGCAG |
| 11C | NRU1 | CMVP antiWalkI | TGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT |
| 12C | NRU1 | Sv40 WalkA | GATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG |
| 13C | PML1 | TyrosWalk1 | GGTCAGGAAGCAACATGAGCAATTCAG |
| 14C | PML1 | TyrosWalkA | AGCCACTCCTCATGGACAAAGACGACTA |
| 15C | PML1 | Sv40 WalkA | GATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG |
| 16C | PML1 | Protamine Walk 1 | CAAAGCCAGAGGGTCTCAGAGTTGCAG |
| 17C | PML1 | CMVP antiWalkI | TGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT |
| 18C | PML1 | Sv40 WalkA | GATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG |

ANNEXE 3

| Secondes réactions de PCR | | | |
|---------------------------|-------------|------------------|------------------------------|
| Réaction | Échantillon | Oligonucleotide | Séquence |
| 1D | 1C | TyrosWalk2 | CTGATGAAAGCCTGGTTGTGTGATGAG |
| 2D | 2C | TyrosWalkB | ACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGT |
| 3D | 3C | SV40 Walk B | GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC |
| 4D | 4C | Protamine Walk 2 | CCATCAAGTGCTTCAGGTATAAATGGGA |
| 5D | 5C | CMVP AntiWalk 2 | CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC |
| 6D | 6C | SV40 Walk B | GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC |
| 7D | 7C | TyrosWalk2 | CTGATGAAAGCCTGGTTGTGTGATGAG |
| 8D | 8C | TyrosWalkB | ACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGT |
| 9D | 9C | SV40 Walk B | GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC |
| 10D | 10C | Protamine Walk 2 | CCATCAAGTGCTTCAGGTATAAATGGGA |
| 11D | 11C | CMVP AntiWalk 2 | CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC |
| 12D | 12C | SV40 Walk B | GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC |
| 13D | 13C | TyrosWalk2 | CTGATGAAAGCCTGGTTGTGTGATGAG |
| 14D | 14C | TyrosWalkB | ACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGT |
| 15D | 15C | SV40 Walk B | GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC |
| 16D | 16C | Protamine Walk 2 | CCATCAAGTGCTTCAGGTATAAATGGGA |
| 17D | 17C | CMVP AntiWalk 2 | CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC |
| 18D | 18C | SV40 Walk B | GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC |

ANNEXE 4

a)

Échelle
d'ADN

1Kb

5000-

3000-

2 000-

1650-

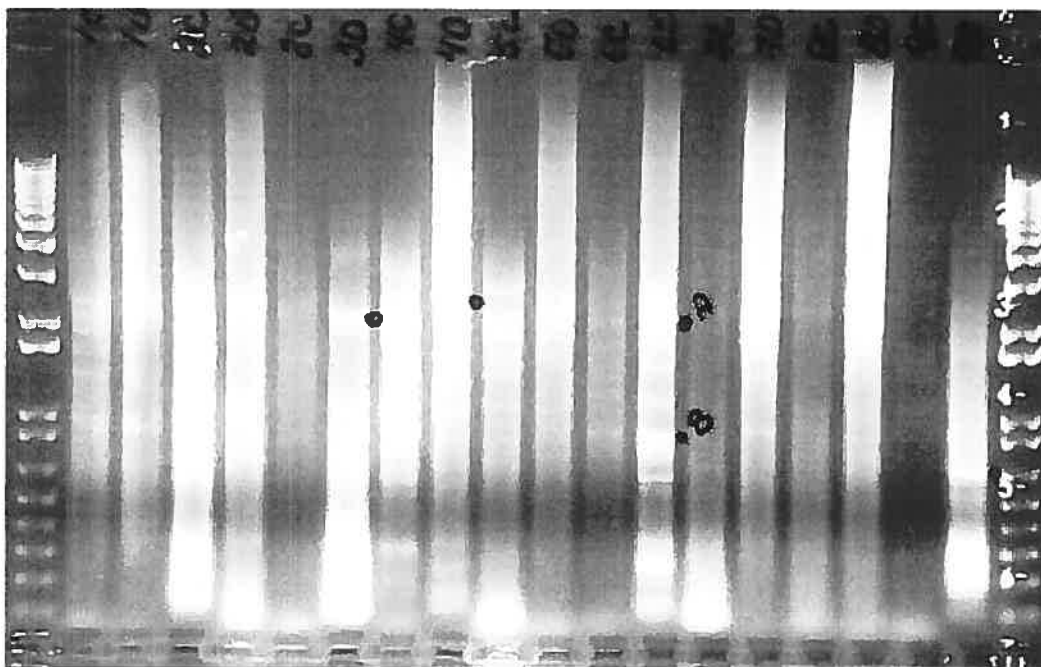
1000-

850-

650-

500-

300-



Résultats du premier et deuxième PCR pour les échantillons 1 à 9

b)

Échelle
d'ADN

1Kb

3 000-

2 000-

1 650-

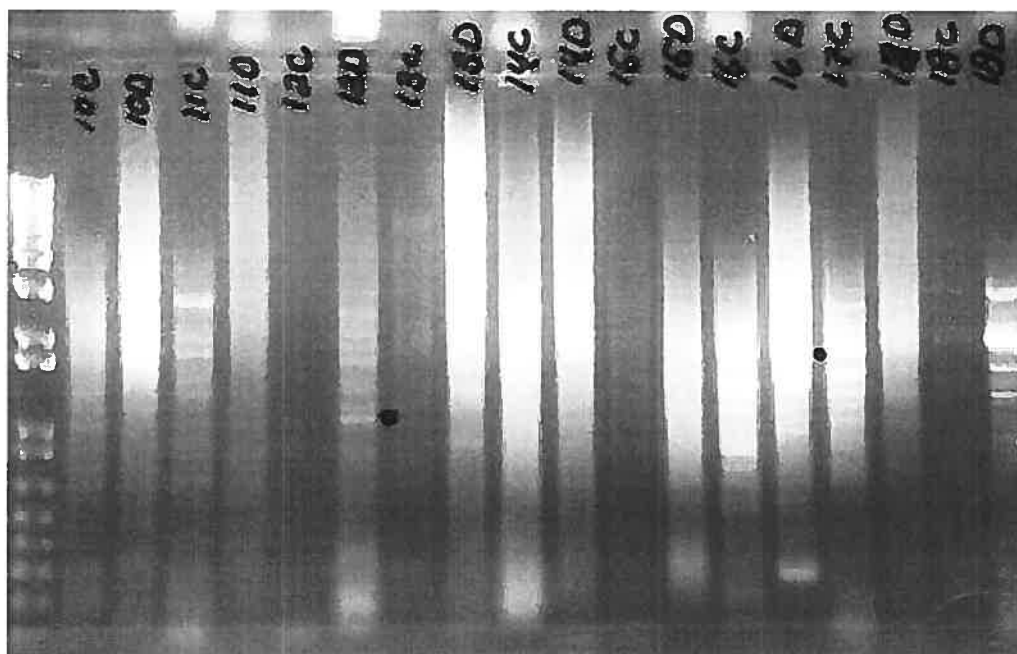
1000-

850-

650-

500-

300-



Résultats du premier et deuxième PCR pour les échantillons 10 à 18.

ANNEXE 5

a.

| Poids des 2 testicules des souris anti-5 homozygotes versus celui des souris anti-5 hétérozygotes entre l'âge de 2 et 4 mois. | | | |
|--|---------------|----------------------|------------|
| Souris homozygotes | | Souris hétérozygotes | |
| Souris | Poids (mg) | Souris | Poids (mg) |
| 13624 | 146 | 13625 | 173 |
| 13626 | 149 | 13627 | 184,51 |
| 13628 | 116,76 | 13629 | 182,37 |
| 05-548-1 | 122,4 | 05-548-4 | 194,4 |
| 05-548-2 | 164,5 | 05-549-3 | 206,6 |
| 05-548-3 | 149,3 | 05-549-6 | 244 |
| 05-549-1 | 158,3 | | |
| 05-549-2 | 156,5 | | |
| 05-549-4 | 178,9 | | |
| 05-549-5 | 168,9 | | |

b.

| Poids des 2 épидидymes des souris anti-5 homozygotes versus celui des souris anti-5 hétérozygotes entre l'âge de 2 et 4 mois | | | |
|---|------------|---------------------------|------------|
| Souris homozygotes | | Souris hétérozygotes (mg) | |
| Souris | Poids (mg) | Souris | Poids (mg) |
| 13624 | 70 | 13625 | 78 |
| 13626 | 37 | 13627 | 50 |
| 13628 | 79,47 | 13629 | 72,46 |
| 05-548-1 | 63,1 | 05-548-4 | 67,0 |
| 05-548-2 | 88,7 | 05-549-3 | 77,2 |
| 05-548-3 | 71,4 | 05-549-6 | 83,7 |
| 05-549-1 | 117,3 | | |
| 05-549-2 | 92,3 | | |
| 05-549-4 | 116,0 | | |
| 05-549-5 | 101,9 | | |

ANNEXE 6

Benchmarks

Rapid Genomic Identification of Transgenic Integration Sites for Mouse Insertional Mutants

BioTechniques 34 32-36 (January 2003)

In cases of transgenic mice displaying a phenotype due to insertional mutagenesis, it is often desirable to clone out the site of transgene integration and to identify the disrupted endogenous gene. Here we report modifications to an existing genomic cloning method that provide a powerful and rapid technique specifically tailored for cloning out transgene insertion sites. These modifications are designed to favor the amplification of bona fide integration sites over internal transgene fragments and are not dependant on prior knowledge of potentially complex transgene rearrangements. When combined with the mouse genome databases now available, this permits the rapid identification of genes inactivated via insertional mutagenesis.

Transgenic mouse lines harboring insertional mutations represent a valuable resource for correlating gene structure with gene function (5,7,12). Cloning the site of transgene insertion has traditionally been an arduous endeavor, involving the creation of a genomic library of mutant mouse DNA usually in lambda phage, and the screening of the library with a labeled probe corresponding to the transgene used. These methods are now supplemented by PCR-based amplification techniques developed to generate flanking genomic DNA sequences (1,2,4,8-11,13,14). Once the integration site is identified, extensive genomic sequencing of normal mouse DNA is still required to identify regional exons and candidate genes to account for mutant phenotypes.

In the present studies, transgenic mice were generated via conventional pronuclear microinjection. Two transgenes were co-injected, including the transgene of interest for the biological studies undertaken and a tyrosinase minigene used as a visual pigmentation marker for transgenesis (6). A founder (F0) animal was identified by the pres-

ence of pigmentation and by PCR analysis for the transgene of interest; analysis of F1 animals revealed that the transgene of interest and the tyrosinase minigene co-segregated in an autosomal fashion, indicating a single transgene integration site incorporating both transgenes. When F2 homozygous animals were generated, a phenotype involving a mild neuromuscular deficit (trembling) was observed, indicating the possibility of an insertional mutation. These trembling animals were confirmed homozygote recessive by backcross breeding trials. Fluorescent in situ hybridization (FISH) using labeled transgenes was then performed on metaphase spreads of splenocytes taken from trembling animals. These studies confirmed that the

animals were homozygote for transgene insertion and identified the site of insertion as mouse chromosome 6 region C (data not shown).

It was decided to clone out the genomic site of transgene integration, adapting the Universal Genome-Walker™ DNA cloning kit (BD Biosciences Clontech, San Jose, CA, USA) for this purpose. DNA was extracted from spleen and kidneys of a mouse homozygous for the transgenes using standard methods. Enzymes for genomic DNA digestions were chosen such that they did not cut within the transgenes used to generate the transgenic mice. Genomic DNA (2.5 µg) was digested separately with *EcoRI*, *KpnI*, *MluI*, *NheI*, *SacII*, *SalI*, *SpeI*, and *SphI*.

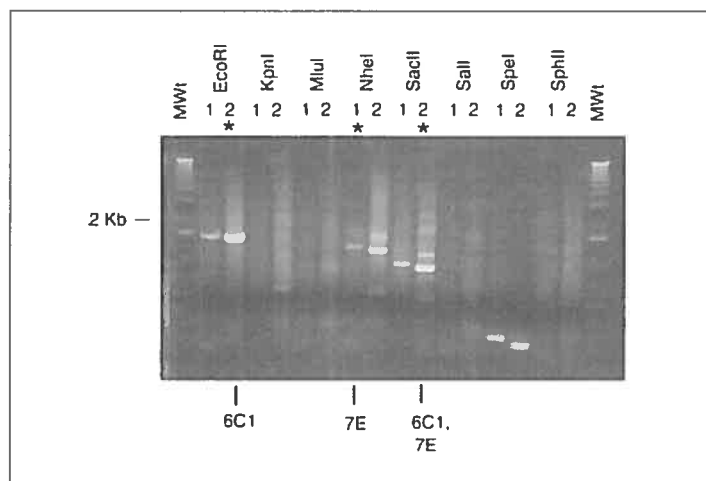


Figure 1. Amplification of restriction enzyme mini-libraries. The amplifications involving the tyrosinase transgene 3'-sense primers are presented, as they were to prove useful in determining the genomic site of integration for the transgenes. The restriction enzymes used to generate the mini-libraries are as marked. The numbers 1 and 2 refer to the primary and the nested PCRs, respectively. The productive amplifications are indicated by an asterisk and are further marked as generating tyrosine sequences (Chr 7E), transgene integration site (Chr 6C1), or both. MWt represents the molecular weight marker (1-kb ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

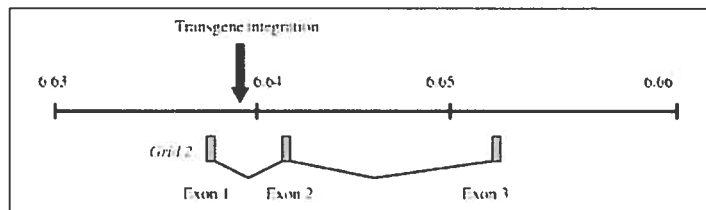


Figure 2. Map of the transgene integration site, within intron 1 of the mouse *Grid2* gene. The numbering (e.g., 6.64) represents a distance of 6.4 million bp from the centromere of mouse chromosome 6.

Benchmarks

Because the restriction enzymes chosen did not cut in a blunt fashion, an additional step to the provided protocol was performed, to blunt the genomic fragments before the adaptor ligation step. Genomic DNA digests were incubated with 1 μ L Klenow DNA polymerase I (USB, Cleveland, OH, USA) and 1.5 μ L 25 mM dNTPs for 1 h at 37°C. Purification of the digested, blunted genomic DNA and ligation to the GenomeWalker adaptor were then performed according to the user manual.

The rationale for specific primer design is as follows. With two transgenes involved, four possible transgene orientations at the site of transgene integration are possible. Specific primers representing three of these possibilities were designed and synthesized, including sense primers from the 3' end of the tyrosinase minigene (TyrosinaseWalk.A, 5'-AGCCACTCCTCATGGACAAAG-ACGACTA-3', and TyrosinaseWalk.B, 5'-ACAGCTTGCTGTATCAGAGCC-ATCTGT-3'). In addition, 3'-sense and 5'-antisense primers from the transgene of interest were also designed but are not presented. PCR and nested PCR were performed as described in GenomeWalker kit user manual. The results obtained using primers TyrosinaseWalk.A and AP1 for the first PCR and TyrosinaseWalk.B and AP2 for the nested PCR are shown in Figure 1. Four out of eight restriction mini-libraries generated identifiable bands suitable for cloning. Bands for *EcoRI* nested PCR, *NheI* primary PCR, and *SacII* nested PCR were subcloned into the pGEM-T[®] vector (Promega, Madison, WI, USA), whereas bands for the *SpeI* PCRs were judged relatively small compared to other bands and were not subcloned. In total, six unique bands were sequenced, and the sequences were blasted with the Ensembl mouse genome data. Sequences of two amplified bands, from the *NheI* and *SacII* restricted mini-libraries, co-localized to genomic sequences within Chr. 7E, representing the endogenous tyrosinase gene locus. Sequences of four amplified bands, two each from the *SacII* and *EcoRI* restricted mini-libraries, co-localized to genomic sequences located at Chr. 6C1 and represented one flank of the transgene integration site. Interestingly, the *SacII* restricted mini-library was able to

identify both the endogenous tyrosinase genomic locus and the transgene insertion site. A more detailed analysis of the transgene integration site at Chr. 6C1 showed that the flanking sequences are located within intron 1 of the *Grid2* gene (Figure 2), thus providing an explanation for the trembling phenotype seen in the homozygote recessive animals (3). As a functional confirmation, RT-PCR studies on RNA extracted from the cerebellum of mice displaying the trembling phenotype failed to show evidence for *Grid2* gene expression, whereas similar analysis on non-trembling (heterozygote) transgenic littermates and on non-transgenic control mice generated an amplified band of the predicted size (data not shown).

Two important modifications to the original Universal GenomeWalker kit protocol were made to accommodate the particularities of transgenic integration sites generated from pronuclear microinjection. We were able to show that the choice of the enzyme is not limited to those that cut in a blunt fashion, although DNA fragments with 5' or 3' overhangs must be subsequently rendered blunt. This allows freedom of choice of restriction enzymes by avoiding enzymes that cut within the transgene. This in turn provides the decided advantage of a method that favors informative amplifications at the site of transgene integration and disfavors noninformative amplifications from within the transgenes themselves. The second modification is the design of specific primers, where because of our two transgene co-injection strategy, four pairs of specific primers were designed for the PCR and nested PCR amplifications. By performing the amplification, cloning, and sequencing steps sequentially, we were able to identify the integration site after using three of these primer sets.

In conclusion, the Universal GenomeWalker Kit protocol is robust and easily adapted for deriving genomic flanking sequences at the site of transgene integration after pronuclear microinjection in mice. Thus, in combination with the mouse genome resources now available, such as Ensembl, provides a powerful and rapid system for identifying disrupted genes in the study of mouse transgene insertional mutagenesis.

REFERENCES

1. Daneau, I., J.F. Ethier, J.G. Lussier, and D.W. Silversides. 1996. Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol. Reprod.* 55:47-53.
2. Harrison, R.W., J.C. Miller, M.J. D'Souza, and G. Kampo. 1997. Easy gene walking. *BioTechniques* 22:650-653.
3. Lalouette, A., J.L. Guenet, and S. Vrzi. 1998. Hotfoot mouse mutations affect the delta 2 glutamate receptor gene and are allelic to huncher. *Genomics* 50:9-13.
4. Megonigal, M.D., E.F. Rappaport, R.B. Wilson, D.H. Jones, J.A. Whitlock, J.A. Ortega, D.J. Slater, P.C. Nowell, and C.A. Felix. 2000. Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9597-9602.
5. Meisler, M.H. 1992. Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet.* 8:341-344.
6. Méthot, D., T.L. Reudelhuber, and D.W. Silversides. 1995. Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 23:4551-4556.
7. Mochizuki, T., Y. Saijoh, K. Tsuchiya, Y. Shirayoshi, S. Takai, C. Taya, H. Yonekawa, K. Yamada, et al. 1998. Cloning of *uvr*, a gene that controls left-right asymmetry and kidney development. *Nature* 395:177-181.
8. Myrick, K.V. and W.M. Gelbart. 2002. Universal fast walking for direct and versatile determination of flanking sequence. *Gene* 254:125-131.
9. Ochman, H., A.S. Gerber, and D.L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-623.
10. Schmidt, M., G. Hoffmann, M. Wissler, N. Lemke, A. Müssig, H. Glimm, D.A. Williams, S. Ragg, et al. 2001. Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum. Gene Ther.* 12:743-749.
11. Screaton, G.R., C.R. Bangham, and J.I. Bell. 1993. Direct sequencing of single primer PCR products: a rapid method to achieve short chromosomal walks. *Nucleic Acids Res.* 21:2263-2264.
12. Shawlot, W., M.J. Siciliano, R.L. Stallings, and P.A. Overbeek. 1989. Insertional inactivation of the downless gene in a family of transgenic mice. *Mol. Biol. Med.* 6:299-307.
13. Siebert, P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov, and S.A. Lukyanov. 1993. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21:1087-1088.
14. Triglia, T., M.G. Peterson, and D.J. Kemp. 1988. A procedure for an in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16:8186.

This work was supported by a fellowship to A. Boyer from the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and research grants from the Na-

Benchmarks

national Science and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Address correspondence to Dr. David W. Silversides, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada. ■■■■■ ■■■■■ ■■■■■

Received 21 August 2002; accepted 11 October 2002.

A. Boyer, M. Paquet, D. Raiwet, I. Daneau, W. Harrison¹, and D.W. Silversides
University of Montreal
St-Hyacinthe, Quebec, Canada
¹Baylor College of Medicine
Houston, TX, USA

For reprints of this or
any other article, contact
Reprints@BioTechniques.com

Deep Screening of Recombination Proficient Bacteriophage Libraries

BioTechniques 34:36-49 (January 2003)

We are using bacteriophage λ as an efficient vector for transferring genomic alterations to embryonic stem (ES) cells via gene targeting. We have developed a variety of phage-plasmid recombination techniques to direct mutations and modification cassettes to specific sites within phage targeting vectors (1,6-9). We have also made improvements on Seed's original method of recombination screening of bacteriophage libraries (5), which allows phage clones to be isolated "genetically" using recombination. In retro-recombination screening (8), phage targeting vectors from an ES cell targeting vector library in λ thymidine kinase (TK) are purified on a restrictive host, following the homologous integration of a *supF*-homology-bearing plasmid, which suppresses A^{am} , B^{am} , and S^{am} mutations in suitable phage λ genes essential for phage growth. Because the region of homology is duplicated upon integration, and can therefore revert under relaxed conditions (i.e., within a *supF* host), we incorporated the *gam* gene into the recombination plasmid to select for phages that have reverted to their original configuration (3). Retro-recombina-

tion screening has several advantages over conventional phage library screening techniques. Specific targeting vector phages can be isolated without plaque hybridization and purified in 2-3 days to serve as templates for the rapid completion of targeting vector construction via recombination. Libraries are screened in culture tubes, meaning that multiple library screens (i.e., targeting vector homology region isolation) can be performed at one time and there is no shortage of the number of phages that can be screened simultaneously to ensure the isolation of distinct clones from the locus of interest. This latter point is particularly important in the case of our λ TK library because the insert size is approximately 12 kb and as many as 2×10^6 phages need to be screened at one time to ensure sufficient representation of all genes within the library.

One drawback of recombination screening approaches is that most libraries, including our λ TK library, are constructed with commercial packaging extracts that are not irradiated when prepared. As a result, a small yet significant number of non-amber phages can appear in a library of amber mutation-containing phages, which arise from recombination between the two mutant strains used to generate head and tail extracts. While the incidence of such phages is rare (i.e., 10^{-4}), it presents a unique challenge in screening amplified libraries by recombination, as

| Samples | Homology (bp) | Recombinant (pfu/mL) | Non-amber (pfu/mL) | Total (pfu/mL) | Frequency |
|---------|---------------|----------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
| 1B2 | 249 | 90 | 188 | 8.0×10^9 | 1.1×10^{-8} |
| 3B6 | 515 | 60 | 246 | 1.0×10^9 | 6.0×10^{-8} |
| 6G2 | 452 | 20 | 229 | 1.0×10^9 | 2.0×10^{-8} |
| 7F5 | 570 | 30 | 157 | 1.3×10^9 | 2.3×10^{-5} |
| 12F2 | 433 | 10 | 145 | 1.0×10^8 | 1.0×10^{-5} |
| 1G7* | 337 | 100 | 460 000 | 1.2×10^{13} | 8.3×10^{-10} |

Following recombination screens, lysates were titrated for blue (recombinant), white (non-amber), and total pfus. The frequency of recombination is presented as the number of blue plaques/total titer. *1G7 was precipitated from a 400-mL culture using PEG and resuspended in a final volume of 0.4 mL. For 1G7, recombinant plaques were determined using DK21. For all others, recombinant plaques were determined using LG75. Non-amber phages were identified as white plaques on LG75. Total titers were determined using LE392.

